

MASSENSPEKTROMETRISCHE UNTERSUCHUNGEN AN FLECHTEN

von
Werner Krause
aus
Öhringen

1976

1977 60



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543128_0073

MASSENSPEKTROMETRISCHE UNTERSUCHUNGEN AN FLECHTEN

Den Naturwissenschaftlichen Fachbereichen
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

zur

Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt

von

Werner Krause

aus

Öhringen

Als Dissertation genehmigt von den Naturwissenschaftlichen
Fachbereichen der Universität Erlangen-Nürnberg

MASSENSPEKTROMETRISCHE
UNTERSUCHUNGEN AN FLECHTEN



Tag der mündlichen Prüfung: 6. 12. 1976

Vorsitzender der Promotionskommission:

Professor Dr. H. Remmert

Erstberichterstatter:

Professor Dr. G. Hesse

Zweitberichterstatter:

Professor Dr. K. Geibel

von
Weiner Krause
aus
Erlangen

Herrn Akad. Dir. Dr. A. Haag möchte ich für mannigfaltige Anregungen zu dieser Arbeit sowie für viele wertvolle Diskussionen danken.

Für die großzügige finanzielle Unterstützung danke ich Herrn Prof. Dr. G. Hesse und Herrn Prof. Dr. P. v. R. Schleyer.

Herrn Dr. O. Schimmer und Herrn Gebhardt vom Botanischen Institut der Universität bin ich für die Bereitstellung von Flechtenproben zu Dank verpflichtet.

Für die Bestimmung von Flechten danke ich Frau Prof. Dr. A. Henssen (Univ. Marburg), Herrn Dr. O. Almborn (Univ. Lund) und Herrn Prof. Dr. H. Hertel (Univ. München).

Herrn Dr. J. Elix (Univ. Canberra) danke ich für die Überlassung von Vergleichsmaterial.

Herrn J. Güntner gilt mein Dank für seine Hilfe bei meßtechnischen Problemen und Herrn Dr. O. Vostrowsky für die Bereitstellung eines Plotters zum Zeichnen von Massenspektren.

ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden Flechten, die sich als Doppellebewesen in idealer Symbiose aus Pilz und Alge zusammensetzen, massenspektrometrisch untersucht. Ziel dieser Analysen war es, möglichst viele Inhaltsstoffe rein massenspektrometrisch - ohne vorherige Abtrennung - in der Pflanze zu identifizieren und potentielle Beziehungen zwischen der taxonomischen Stellung sowohl der Gesamtflechte als auch den einzelnen Symbionten und ihrer chemischen Zusammensetzung herzuleiten.

Werden Teile einer Flechte - in günstigen Fällen genügen Nanogramm-Mengen - in einem Mörser fein zermahlen und mittels Direkteinlaß in ein Massenspektrometer eingebracht, so erhält man ein komplexes Spektrum, das alle Komponenten enthält, deren Dampfdruck dem im Gerät herrschenden Druck von 10^{-6} Torr entspricht. Bei Erhöhung der Einlaßtemperatur werden weitere Substanzen diese Grenze erreichen und nacheinander im Spektrum erscheinen.

Eine Identifizierung einzelner Inhaltsstoffe wird nun umso leichter sein, je größer der Konzentrationsunterschied der gesuchten Komponente zu den als "Untergrund" zu betrachtenden übrigen Substanzen ist und je "charakteristischer" das Massenspektrum der Komponente an sich ist.

Für die "sekundären" Flechteninhaltsstoffe ist die erste Bedingung (hohe Konzentration) in vielen Fällen erfüllt, die zweite jedoch nur für einige Verbindungsklassen wie Anthrachinone, Xanthone, Pulvinsäurederivate, Depsidone u.a.. Für die sehr wichtigen und weit verbreiteten Depside hingegen, die aus Gemischen heraus oft keine Molekülonen zeigen, sondern nur in wenig charakteristische Bruchstücke zerfallen, wird diese Voraussetzung fast nie erreicht. Um auch hier Zuordnungen treffen und Isomere unterscheiden zu können, wurden Derivatisierungen dieser Verbindungen in der Flechte - ohne vorherige Isolierung - durchgeführt. Zur Anwendung kamen dabei Methylierung, Silylierung, Acy-

lierung (Acetylierung und Trifluoracetylierung), Umsetzung mit Triäthylboran, H/D-Austausch und Hydrierung.

Bei den "primären" Stoffwechselprodukten (Fettsäuren, Fette, Sterine, Terpene, Kohlenhydrate) wird die hohe Konzentration der sekundären Metaboliten (bis zu 25% des Trockengewichts der Flechte) nicht erreicht; dagegen ist die zweite Bedingung (charakteristisches Spektrum) abgesehen von den Kohlenhydraten, die nicht unzersetzt verdampfbar sind, fast immer erfüllt, so daß auch diese Verbindungen untersucht werden konnten. Die Kohlenhydrate wurden spektroskopierbar gemacht durch die Umsetzung mit den oben genannten Derivatisierungsmitteln.

Zur Erkennung von Inhaltsstoffen, die nur in sehr geringer Konzentration vorliegen, wurden Mikro-Extraktionen und -Sublimationen durchgeführt.

Beim Vergleich der massenspektrometrisch bestimmten Stoffwechselprodukte von insgesamt 32 willkürlich ausgewählten Flechtenarten stellt man fest, daß keine zwei Species denselben Satz von Verbindungen produzieren, während umgekehrt Flechten derselben Art, die an verschiedenen Standorten gesammelt wurden, auf Grund ihrer praktisch gleichen Massenspektren eindeutig als identisch erkannt werden können.

Um jedoch weitergehende taxonomische Schlüsse, v.a. auf die einzelnen Symbionten ziehen zu können, muß erst die Taxonomie der Flechten selbst abgeschlossen sein, und es müssen mehr Daten über die immer noch schwer zu bestimmenden Algenpartner vorliegen.

Die vorliegende Arbeit zeigt, daß mit Hilfe der Massenspektrometrie - v.a. bei Kombination der "Derivatspektrometrie" mit der reinen Flechtenmassenspektrometrie - nicht nur viele auf konventionellem Weg gefundene Inhaltsstoffe zu verifizieren sind, sondern auch neue Metaboliten ohne langwierige Untersuchungen wahrscheinlich gemacht werden können. Hiermit ergibt sich einerseits die Möglichkeit, zwei unbekannte Flechtenspecies ohne aufwendige taxonomische Bestimmungen auf ihre Identität hin zu überprüfen, andererseits können bei noch nicht untersuchten Arten mit diesem Verfah-

ren wertvolle Hinweise auf die vorhandenen Inhaltsstoffe erhalten werden, die dann in gezielte Isolierungsmethoden einmünden können.

In Tabelle 6 (auf Seite 134) sind die massenspektrometrisch gefundenen sekundären Stoffwechselprodukte aller untersuchten Flechten zusammengestellt.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A. EINLEITUNG	1
I. Flechten - allgemein	1
II. Flechtenanalytik	2
1. Konventionelle Methoden	2
2. Flechtenmassenspektrometrie	4
3. Chemotaxonomie	5
B. EXPERIMENTELLER TEIL	6
I. Meßtechnik	6
II. Derivatisierung	8
1. Methylierung	9
2. Silylierung	10
3. Acylierung	13
4. Umsetzung mit Triäthylboran	15
5. Umsetzung mit Aceton	16
6. H/D-Austausch	17
7. Hydrierung	17
III. Anreicherung	18
1. Extraktionen	19
2. Sublimation	19
C. MASSENSPEKTROMETRISCHER TEIL	26
I. Depside	26
1. Atranoringruppe	30
2. Lecanorsäure	40

	Seite
3. Perlatolsäure	40
4. Squamatsäure	42
5. Thamnolsäure	43
6. Peltigerin	44
7. Gyrophorsäure	47
II. Depsidone	51
1. Fumarprotocetrarsäure	52
2. Stictinsäuregruppe	54
3. Physodsäuregruppe	58
4. Alektoronsäuregruppe	66
5. "Tridepsidone"	68
III. Usninsäure	70
IV. Terpene, Sterine	74
V. Verschiedenes	82
1. Siphulin	82
2. Phosphat	83
3. Carotine	83
VI. Fettsäuren	84
VII. Fette	93
1. Triglyceride	93
2. Diglyceride	96
VIII. Kohlenhydrate	105
1. Trifluoracetylierung	106
a) Zuckeralkohole	107
b) Mono- und Disaccharide	111
c) Glycoside von Zuckeralkoholen	114
d) Polysaccharide	120
2. Andere Derivatisierungsverfahren	122
D. LITERATURVERZEICHNIS	187

A. EINLEITUNG

I. Flechten - allgemein

Flechten, die in der Natur zumeist an extremen Standorten auftreten, sind Doppellebewesen aus Pilz und Alge, die in idealer Symbiose eine Einheit mit völlig neuen Eigenschaften bilden.

Für den Chemiker sind sie insofern interessant, als sie neben den primären Stoffwechselprodukten der einzelnen Symbionten eine Fülle komplizierter sekundärer Metaboliten produzieren, deren Anteil am Trockengewicht bis zu 10%, in Extremfällen bis zu 20% betragen kann.

Über die Funktion dieser Verbindungen, die immer in der aktivsten Wachstumsphase der Pflanze gebildet und dann in kristalliner Form abgelagert werden und unter denen man substituierte Benzoessäurephenylester ebenso findet wie Anthrachinone, Xanthone oder auch Terpene, wurden viele Spekulationen angestellt:

- a) antibiotische Wirkung
- b) Schutz vor dem Austrocknen
- c) Komplexierung von Schwermetallen
- d) Schutz gegen übermäßige Sonneneinstrahlung
- e) Wellenlängenfilter (das Absorptionsmaximum von Chlorophyll entspricht dem Fluoreszenzmaximum von Atranorin)
- f) Erhöhung der Permeabilität der Algenzellwände
- g) reine Abfallprodukte ohne Funktion

Da auch nicht-flechten-bildende Pilze Inhaltsstoffe produzieren, die den Flechtensubstanzen sehr ähnlich oder sogar identisch mit ihnen sind, kann man den sekundären Metabolismus auch nicht als "Kopplungsstück" der Symbiose betrachten. In neuester Zeit hofft man, über den Biosyntheseweg dieser Verbindungen Rückschlüsse auf ihre Funktion ziehen zu können.

Zusammenfassungen über die Biosynthese, die über drei Wege

verläuft:

- a) Acetat-Polymalonat-Gruppe
- b) Shikimisäure-Gruppe
- c) Mevalonsäure-Gruppe

findet man bei S. Huneck ¹⁾, C. H. Fox ²⁾, K. Mosbach ³⁾ und C. F. Culberson ⁴⁾.

II. Flechtenanalytik

Seit dem Beginn der analytischen Arbeiten über Flechteninhaltsstoffe durch W. Nylander ⁵⁾ Mitte des vorigen Jahrhunderts hat sich die Kenntnis über Vorkommen und Struktur typischer Metaboliten auf heute nahezu 350 Verbindungen ausgedehnt.

Im folgenden sollen kurz die wesentlichsten Merkmale der üblichen Analysenverfahren dargestellt werden. Dabei muß man prinzipiell unterscheiden zwischen Methoden, die an der Gesamtflechte und solchen, die an Einzelverbindungen oder Extrakten durchgeführt werden. Der Flechtenmassenspektrometrie soll bei dieser Darstellung ein eigenes Kapitel gewidmet sein.

1. Konventionelle Methoden

Die ersten Untersuchungsmethoden waren die von W. Nylander eingeführten Farbreaktionen, bei denen der Flechtenthallus, mit einem Reagenz versetzt, je nach Art des Inhaltsstoffs eine charakteristische Färbung zeigt. Die vier wichtigsten Reagentien sind:

- K: wäßrige KOH-Lösung (Chinone: rot bis violett;
Depside, Depsidone: grün)
- C: wäßrige $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ -Lösung (phenolische OH-Gruppen
in 1.3-Stellung, bei freier 2-Position:
rosa bis rot)

PD: alkoholische p-Phenylendiamin-Lösung (aromat.
Aldehyd: gelb bis rot)

FeCl_3 : wässrige oder alkoholische FeCl_3 -Lösung (enoli-
sche OH-Gruppen)

Durch die Kombination verschiedener Tests ergeben sich weitere Eingrenzungen der gesuchten Verbindung. Anleitungen zur Herstellung und zum Gebrauch der Lösungen findet man bei M. E. Hale ⁶⁾.

Eine Abwandlung in der Durchführungsart stellt die Filterpapiermethode von J. Santesson ⁷⁾ dar, bei der den Tüpfeltests eine Mikroextraktion des Thallus - durchgeführt auf einem Stück Filterpapier - vorangeht. Eine Überlagerung von Farbreaktionen durch die Anwesenheit verschiedenartiger Inhaltsstoffe wird hier vermieden.

Bei der Mikroextraktion von Y. Asahina ⁸⁾ werden Thallusstücke auf dem Objektträger eines Mikroskops mit einem geeigneten Lösungsmittel versetzt und die erhaltenen Kristalle mit bekannten Verbindungen verglichen. Abbildungen von Kristallformen beschreiben C. F. Culberson ⁹⁾, C. J. Taylor ¹⁰⁾ und J. W. Thomson ¹¹⁾.

In einer UV-photometrischen Untersuchung wurde von J. L. Ramaut et al. ¹²⁾ der Gehalt einer Flechte an Usninsäure ohne vorherige Isolierung bestimmt.

Papierchromatographische Verfahren, von C. A. Wachtmeister ¹³⁾ eingeführt, und früher viel verwendet, wurden fast vollständig durch die Dünnschichtchromatographie verdrängt. Tabellen über R_f -Werte findet man bei J. Santesson ¹⁴⁾ und S. Huneck ¹⁵⁾. C. F. Culberson ¹⁶⁾ beschreibt eine standardisierte DC-Methode mit Norstictinsäure und Atranorin als Referenzsubstanzen.

Die Gaschromatographie wurde in der Flechtenanalytik nur vereinzelt eingesetzt. N. Ikekawa ¹⁷⁾ und S. Shibata ¹⁸⁾ untersuchten Triterpene, J. L. Bloomer ¹⁹⁾ bearbeitete Protolichesterinsäure.

Hochdruck-Flüssigkeits-chromatographische Arbeiten sind erst in der neuesten Literatur zu finden. ¹³¹⁾

IR-Daten isolierter Inhaltsstoffe beschreiben S. Huneck²⁰⁾ und J. Santesson²¹⁾, NMR-Daten S. Huneck u. P. Linscheid²²⁾.

Die auch heute noch gebräuchlichsten Analysenverfahren sind die Tüpfeltests und die Mikroextraktion, da sie schnell und ohne großen Aufwand durchzuführen sind. Vor allem bei taxonomischen Bestimmungen haben sie sich ihre Bedeutung erhalten können.

2. Flechtenmassenspektrometrie

Bei der von J. Santesson²³⁾ entwickelten Flechtenmassenspektrometrie werden kleine Proben einer Flechte - ohne Vorbehandlung - mittels Direkteinlaß in das Massenspektrometer gebracht und die dabei verdampfenden Inhaltsstoffe untersucht. Bei einem Druck von 10^{-7} Torr erscheinen nun alle Substanzen, deren Dampfdruck diesen Wert überschreitet. Erhöht man die Temperatur im Einlaßsystem, so werden weitere Verbindungen diese Grenze erreichen und fraktionierend aus dem komplexen Gemisch der Inhaltsstoffe heraussublimieren. Quantitative Messungen Santessons zeigten, daß bei *Pertusaria lutescens* noch 20 - 50 Nanogramm an Flechten genügen, Thiophaninsäure nachzuweisen, die ca. 2% des Trockengewichts ausmacht. Bei *Haematomma coccineum* waren bereits weniger als 10 ng Flechte ausreichend, um Usninsäure (10% des Trockengewichts) eindeutig zu identifizieren (Signal/Rausch-Verhältnis besser als 20:1). Insgesamt erreicht man also in günstigen Fällen eine Erfassungsgrenze von 1 ng - ohne die Verbindungen vorher isolieren zu müssen.

Seit den ersten Arbeiten Santessons über die Flechtenmassenspektrometrie, in denen er Usninsäure, Zeorin, Pulvinsäurederivate, Anthrachinone und Xanthone behandelte, sind nur noch wenige Berichte - und meist von diesem Autor - erschienen, so unter anderem Untersuchungen über Atranorin²⁴⁾, Picrolicheninsäure²⁵⁾ und Anthrachinone in

Caloplaca ²⁶⁾. Alle untersuchten Verbindungsklassen außer Atranorin und Zeorin zeigen intensive Molekülionen und sind daher - vor allem in Verbindung mit ihren charakteristischen Fragmenten - leicht zu identifizieren. Depside - außer Atranorin - und Depsidone wurden flechtenmassenspektrometrisch bisher vernachlässigt, ebenso alle anderen, noch in der Flechte vorkommenden Inhaltsstoffe, wie Fette, Sterine oder Kohlenhydrate.

In der vorliegenden Arbeit sollten auch diese Metaboliten - auch im Hinblick auf eine mögliche chemotaxonomische Relevanz - mit einbezogen werden.

Dazu wurde die Flechtenmassenspektrometrie Santessons ausgeweitet zu einer Art "Derivatspektroskopie", bei der die Pflanzeninhaltsstoffe in der Flechte selbst mit einem geeigneten Reagenz umgesetzt werden und dann das Spektrum der "derivatisierten Flechte" mit dem ursprünglichen Flechtenmassenspektrum verglichen wird. Hierdurch werden Unterscheidungen von Isomeren möglich sowie die Einbeziehung neuer Substanzklassen, wie etwa der Kohlenhydrate, die underivatisiert zu wenig flüchtig sind, um massenspektrometrisch untersucht werden zu können.

3. Chemotaxonomie

Nach V. Ahmadjian ²⁷⁾ ist kein Gebiet der Lichenologie so widersprüchlich wie die Chemotaxonomie von Flechten. Daher ist es auch nicht verwunderlich, daß man sich bis jetzt noch nicht darüber einigen konnte, ob chemische Merkmale überhaupt zur Bestimmung herangezogen werden sollten.

In der vorliegenden Arbeit wird nun insofern Chemotaxonomie betrieben, als alle Daten, die sich massenspektrometrisch über eine Flechte gewinnen lassen, also der Gehalt an sekundären Stoffwechselprodukten ebenso wie das Vorkommen primärer Metaboliten wie Fettsäuren, Fette, Sterine, Terpene und Kohlenhydrate, zusammengetragen und mit den Angaben über Ordnung, Unterordnung, Familie, Gattung und Art,

sowie - wenn möglich - dem Phycobionten (Algenpartner) verglichen werden.

Es sollte jedoch betont werden, daß hier nur die Art, wie man diese Informationen gewinnen kann, beschrieben ist, nicht aber, welche Schlüsse hinsichtlich der Taxonomie daraus zu ziehen sind. Denn dazu reicht das untersuchte Material nicht aus.

B. EXPERIMENTELLER TEIL

I. Meßtechnik

Alle abgebildeten Massenspektren wurden mit dem Gerät CH-4B der Varian MAT GmbH, Bremen, ausgestattet mit einer EFO 4B-Ionenquelle, unter folgenden Standardbedingungen für den Elektronenstoßbetrieb aufgenommen:

Spalte:	0,03/0,07 mm
Auffänger:	SEV 1,6 bis 2,0 kV
Elektronenenergie:	70 eV
Emission:	20 μ A
Quellentemperatur:	180 - 200 °C

Bei der Untersuchung von Elektronenanlagerungsspektren wurden diese Parameter zum Teil modifiziert:

Spalte:	0,1/0,3 mm
Auffänger:	SEV 2,0 kV
Elektronenenergie:	70 eV
Emission:	40 μ A
Quellentemperatur:	180 - 200 °C

Die Einstellung der Verdampfungstemperatur im Einlaßsystem für Festproben orientiert sich an der Flüchtigkeit der zu untersuchenden Substanzen, wobei man ungefähre Auftrittsgrenzen für einzelne Verbindungsklassen festlegen kann:

Depside:	90 - 120°C
Depsidone:	>150°C
Anthrachinone:	130 - 160°C
Fettsäuren:	<90°C
Diglyceride:	150 - 180°C
Triglyceride:	>180°C

Für die Untersuchung trifluoracetylierter und silylierter Kohlenhydrate wurde auch der Hochtemperatureinlaß (HTE) mit einer Temperatur des Dampfreservoirs von 150°C eingesetzt. Bei den silylierten Derivaten traten hier jedoch starke thermische Fragmentierungen (Abspaltung von HOSiMe_3) ein, die im Direkteinlaß, bei dem schon 20°C zu hinreichender Verdampfung genügen, vermieden werden konnten.

Für die dargestellten Massenspektren gilt allgemein:

1. Die Strichspektren zeigen die relevanten Ionen in der auf den Basispeak (100%) bezogenen relativen Intensität. Wichtige Peaks mit geringer Intensität konnten der Übersichtlichkeit wegen jedoch nicht immer eingezeichnet werden. Sind in den Diagrammen mehr als ein Verstärkungsfaktor einzelner Teilbereiche angegeben (z.B. >390 x 5, >600 x 50), so beziehen sich alle Faktoren auf denselben Ausgangsfaktor 1, der nicht immer eigens angegeben ist.
2. Zur Identifizierung einzelner Flechtenstoffe wurden die Massenspektren authentischer Verbindungen - soweit verfügbar - herangezogen. Einige MS-Daten wurden der Literatur entnommen.
3. Sofern eine Komponente in den Gemischspektren als identifiziert angegeben wird, stimmen die Massenzahlen und relativen Ionen-Intensitäten innerhalb vertretbarer Grenzen mit denen authentischer Verbindungen bzw. den Angaben aus der Literatur überein. Inhaltsstoffe, bei denen keine Vergleichsspektren vorhanden waren, gelten dann als hinreichend identifiziert, wenn ihre Fragmentierung analog zu vergleichbaren, gesicherten Strukturen gefunden wurde.

4. In den Fragmentierungsschemata sind nur die wichtigsten Abbauege verzeichnet. Sie entsprechen den bekannten empirischen Regeln.

Bei der Aufnahme von Gesamtflechten-Spektren wurden die Pflanzen vor der Messung mechanisch gesäubert und an der Luft getrocknet. Die Probenentnahme erfolgte statistisch, wobei - wenn möglich - sowohl Teile vom Thallus als auch von Fruchtkörpern verwendet wurden, da sich quantitative Unterschiede im Gehalt an Inhaltsstoffen bei den verschiedenen Pflanzenteilen herausstellten. Zum Zerkleinern der Flechten genügt ein Achat-Mörser, da Versuche mit der Kugelmühle keinerlei Unterschiede im Spektrum ergaben. Für die massenspektrometrische Untersuchung wurden ca. 10 µg Flechte eingesetzt.

II. Derivatisierung

Bei der "Derivatspektroskopie" werden Flechteninhaltsstoffe vor der massenspektrometrischen Untersuchung ohne vorherige Isolierung - direkt in der Pflanze - mit Reagentien umgesetzt, die - und das ist eine Grundbedingung - an vorhandenen funktionellen Gruppen angreifen und neue Verbindungen mit anderen spektrometrischen Eigenschaften bilden.

Aus den hieraus erhaltenen Massenspektren lassen sich dann in Kombination mit den eigentlichen Flechtenspektren zusätzliche Aussagen über die Struktur der untersuchten Moleküle machen.

Als nicht unerwünschten Nebeneffekt dieser Derivatisierungen erzielt man eine beträchtliche Erhöhung der Flüchtigkeit, - die z.B. bei den Kohlenhydraten eine massenspektrometrische Analyse überhaupt erst möglich macht - und eine "Dehnung" der Spektren über einen größeren Massenbereich, die zu besserer Übersichtlichkeit und damit leichterer Interpretation führt.

Naturgemäß müssen hierbei jedoch eine Reihe von Bedingungen

beachtet werden:

1. Verwendung reiner Derivatisierungsmittel
2. leichte Entfernbarkeit überschüssigen Reagenzes und evtl. entstehender Nebenprodukte
3. Vermeidung von "unvorhersehbaren" Veränderungen an den zu derivatisierenden Verbindungen

Da auch leicht zersetzliche Derivate wie Trimethylsilyl- und Trifluoracetyl-Verbindungen untersucht werden, darf die Umsetzung erst unmittelbar vor der Messung durchgeführt werden. Bei gleichartigen Derivatisierungen sollte, wenn man die individuellen Reaktionsgeschwindigkeiten nicht kennt, immer die gleiche Reaktionsdauer angesetzt werden, da nur auf diese Weise direkte Vergleiche gezogen werden können.

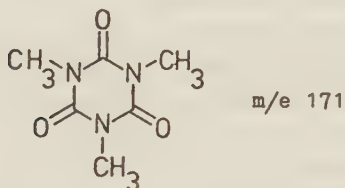
1. Methylierung

Von den üblichen Methoden zur Methylierung - CH_2N_2 , $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}^+$, $\text{CH}_3\text{OH}/\text{BF}_3$ - kann nur das Diazomethanverfahren angewendet werden, da es am schonendsten ist und alle oben genannten Bedingungen erfüllt. Reaktionen, die unter Säurekatalyse verlaufen, führen zu Veränderungen an den zu derivatisierenden Verbindungen (z.B. Esterspaltung von Depsiden).

Aus Nitrosomethylharnstoff mit wäßriger KOH hergestellte ätherische Diazomethanlösung (etwa 2 ml) läßt man unter Rühren über Nacht auf ca. 1 - 2 mg fein gemahlene Flechte einwirken. Nach Abziehen der flüssigen Phase im Wasserstrahlvakuum wird der Rückstand direkt vermessen.

Derivatisiert werden freie Säuren, z.B. Fettsäuren²⁸⁾, phenolische OH-Gruppen²⁹⁾ und Kohlenhydrate. P. Kovác³⁰⁾ beschreibt den Methylierungsgrad verschiedener Zucker. Das bei der Diazomethanzersetzung als Nebenprodukt anfallende Polymethylen stört bei der Analyse nicht, da es zu wenig flüchtig ist, um im Massenspektrum zu erscheinen.

Als einzige Peaks, die durch Artefakte hervorgerufen werden, treten bei Verwendung von N-Nitroso-N-methylharnstoff m/e 171, 143, 142 sowie 103 auf, die durch Fragmentierung von N,N',N''-Trimethyltriazintrion entstehen.



2. Silylierung

1 - 2 mg gemahlene Flechte werden mit ca. 1 - 2 ml Silylierungsreagenz, das gleichzeitig als Lösungsmittel dient, versetzt. Man läßt über Nacht rühren, dampft das Reagenz im Vakuum ab und untersucht den Rückstand möglichst rasch.

Eingesetzt wurden folgende Silylierungsmittel:

Trimethylchlorsilan (TMCS)

Hexamethyldisilazan (HMDS) - TMCS (2 : 1)

N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid (BSTFA)

N-Methyl-N-trimethylsilyltrifluoracetamid (MSTFA)

Trimethylchlorsilan, das von C. C. Sweeley ³¹⁾ eingeführt wurde, ist ein relativ schwaches Silylierungsmittel, kann jedoch wegen seines niedrigen Siedepunktes (59°C) sehr leicht wieder entfernt werden. Nachteilig sind die unvermeidbaren Nebenreaktionen mit dem in der Flechte vorhandenen Wasser, die zu cyclischen Polysiloxanen $[(CH_3)_2SiO]_n$ führen und unter Umständen alle anderen Peaks im Spektrum überdecken können. Als Signale dieser Verbindungen treten auf

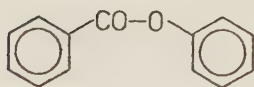
$[M - CH_3]^+$ und $[M - CH_3 - n(CH_3)_2SiO]^+$. Die Molekülionen selbst sind nicht zu beobachten. Kürzlich erschien eine Arbeit über Spektren derartiger Verbindungen von G. R. Pickering³²⁾. Die störenden Polysiloxane können durch Extraktion mit n-Hexan entfernt werden; allerdings werden dabei auch unpolare Flechtenbestandteile mit erfaßt, so daß die resultierenden Massenspektren dann nicht mehr das ursprüngliche Bild der Inhaltsstoffe wiedergeben.

Bei Verwendung von HMDS - TMCS (2:1) ist die Polysiloxanbildung weniger stark ausgeprägt, die Silylierungsstärke jedoch vergrößert, so daß diese Mischung vorzuziehen ist. Der Vorteil der beiden letzten Reagentien ist ihre hohe Reaktivität, die leichte Flüchtigkeit der gebildeten Trifluoressigsäure (Sdp. $72^\circ C$), sowie das Fehlen jeglicher Polysiloxanbildung. Nachteilig ist der hohe Siedepunkt der Derivatisierungsmittel selbst (BSTFA: $40^\circ C/12\text{ mm}$, MSTFA: $132^\circ C$).

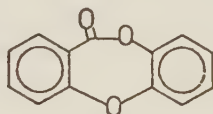
Verwendet man BSTFA zur Silylierung von Substanzen in der Gesamtflechte, so entstehen bei kurzer Reaktionsdauer (über Nacht) die TMS-Derivate. Bei längerer Umsetzungs-dauer (4 Tage) erhält man eine kombinierte Umwandlung: OH-, SH- und NH_2 -Gruppen sind trifluoracetyliert, COOH-Funktionen dagegen silyliert. Der Mechanismus dieser Reaktion kann nur so erklärt werden, daß zunächst alle funktionellen Gruppen silyliert werden und anschließend, - wenn durch das in der Flechte vorhandene Wasser genügend freies CF_3COOH gebildet worden ist - eine Verdrängung der TMS- gegen CF_3CO -Gruppen stattfindet. Arbeitet man dagegen völlig wasserfrei, z.B. in Extrakten, so wird nur silyliert. Carboxylgruppen reagieren nicht auf diese Weise, da die entstehenden gemischten Anhydride äußerst instabil sind. Gleichermäßen kann bei der Silylierung von Depsiden in der Flechte nicht ausgeschlossen werden, daß durch Spuren von Wasser unter Mitwirkung von eventuell gebildeter Trifluoressigsäure zum Teil Depsidbindungen gespalten werden. Man erhält so vollständig derivatisierte Einzelteile, die

zur Unterscheidung isomerer Formen herangezogen werden können.

Bei der Untersuchung von Depsidonen konnten derartige Spaltungen jedoch nicht festgestellt werden.

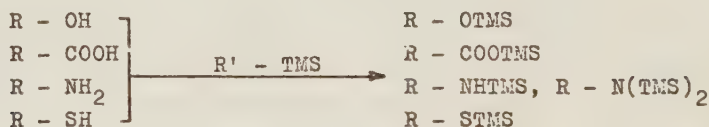


Depsid(gerüst)



Depsidon(gerüst)

Die allgemeinen Umsetzungsmöglichkeiten sind der folgenden Aufstellung zu entnehmen:



Hydroxylgruppen werden unter milden Bedingungen silyliert bei Alkoholen - bei Fettalkoholen beschrieben von R. Wood ³³⁾, bei Phenolen ³⁴⁾, sowie bei Kohlehydraten ³⁵⁾, insbesondere Zuckeralkoholen ³⁶⁾³⁷⁾.

Hydroxylgruppen in Steroiden reagieren nur leicht, wenn sie nicht sterisch gehindert sind ³⁸⁾. Bei sterischer Hinderung müssen starke Silylierungsmittel (z.B. BSTFA) und eventuell Katalysatoren (TMCS) eingesetzt werden ³⁹⁾. Carboxylgruppen reagieren schnell ⁴⁰⁾, Aminogruppen hingegen, v.a. in Aminosäuren, sind nur schwierig umzusetzen,

und die entstandenen Reaktionsprodukte sind meist uneinheitlich ⁴¹⁾.

Thiolgruppen, die am wenigsten Reaktivität zeigen, sollen hier außer acht gelassen werden.

3. Acylierung

Acylderivate sind üblich bei Hydroxy-, Amino- und Thiol-Funktionen.

Entgegen der normalen Darstellungsweise wird auch hier wieder auf ein Lösungsmittel verzichtet, und die Flechteninhaltsstoffe werden direkt mit Acylierungsreagenz im Überschuß umgesetzt.

Man läßt auf die fein gemahlene Flechte (1 - 2 mg) ca. 2 ml Acetanhydrid oder Trifluoressigsäureanhydrid unter Rühren über Nacht einwirken, zieht das überschüssige Reagenz sowie die entstandenen freien Säuren im Wasserstrahlvakuum ab und kann dann den Rückstand direkt vermessen.

Während Trifluoressigsäure und ihr Anhydrid (Sdp. $72^{\circ}/40^{\circ}\text{C}$) sofort beim Anlegen des Vakuums verdampfen, muß bei Acetanhydrid und Essigsäure erwärmt werden (Sdp. $140^{\circ}/118^{\circ}\text{C}$).

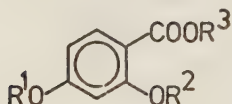
Da die Produkte mit Trifluoracetylresten, vor allem im Kohlenhydratbereich, wesentlich flüchtiger sind als die nicht derivatisierten Flechtenbestandteile, gelingt es mit Hilfe dieser Umsetzung, die Temperaturschwelle im Massenspektrum, die normalerweise bei ca. 50°C liegt - i.e. die Temperatur, bei der die meisten Verbindungen zu verdampfen beginnen -, auf Werte unter 20°C herabzusetzen. Entsprechendes ist - weniger stark ausgeprägt - bei der Silylierung möglich.

Betrachtet man Derivatspektren, die in diesem Temperaturbereich aufgenommen wurden, so findet man ausschließlich umgesetzte Zucker, also Verbindungen, die ohne Derivatisierung sich der Massenspektrometrie völlig entziehen,

da ihre Zersetzungstemperatur niedriger ist als ihre Verdampfungstemperatur.

Als Nebenreaktion der Trifluoracetylierung muß unbedingt die stark kondensierende Wirkung von TFA berücksichtigt werden, die bei den Depsiden - sofern freie OH- und COOH-Gruppen vorhanden sind - zu nicht mehr flüchtigen "Polydepsiden" führen kann.

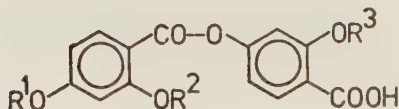
Als Modellschubstanz wurde hier β -Resorcylsäure mit Trifluoressigsäureanhydrid umgesetzt. Man erhält dabei folgende, im Spektrum (Abb. 1) sichtbare Verbindungen:



I: $R^1 = \text{COCF}_3$, $R^2 = R^3 = \text{H}$ m/e 250

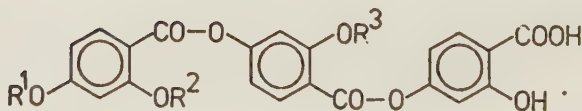
II: $R^1 = R^2 = \text{COCF}_3$, $R^3 = \text{H}$ m/e 346

III: $R^1 = R^2 = R^3 = \text{COCF}_3$ m/e 442



IV: $R^1 = R^2 = \text{COCF}_3$, $R^3 = \text{H}$ m/e 482

V: $R^1 = R^2 = R^3 = \text{COCF}_3$ m/e 578



VI: $R^1 = R^2 = \text{COCF}_3$, $R^3 = \text{H}$ m/e 618

VII: $R^1 = R^2 = R^3 = \text{COCF}_3$ m/e 714

Nebenbei sei bemerkt, daß TFA schon verschiedentlich erfolgreich zur Depsidsynthese ⁴²⁾⁴³⁾⁴⁴⁾⁴⁵⁾ eingesetzt wurde.

Die Vermutung, daß Depsidbindungen auch wieder gespalten werden können unter Bildung eines gemischten Anhydrids (Säureteil) und eines Esters (Phenolteil) konnte bei der Trifluoracetylierung von Atranorin wahrscheinlich gemacht werden. Man findet u.a. einen vollständig derivatisierten Phenolteil - was nur nach vorheriger Spaltung der Depsidbindung möglich ist. Ob der Säureteil zum gemischten Anhydrid mit Trifluoressigsäure umgesetzt wird, kann wegen der Überlagerung mit Atranorin-TFA massenspektrometrisch nicht festgestellt werden.

Analoge Untersuchungen an Psoromsäure (Depsidon) zeigten, daß hier keine Spaltung der Esterbindung stattfindet.

Befürchtungen, daß auch im Kohlenhydratbereich Kondensationen eintreten könnten, erwiesen sich nach der Umsetzung von Zuckergemischen als unbegründet.

Führt man die Trifluoracetylierung an einer Flechte durch, die vorher silyliert worden war, so werden alle TMS-Gruppen durch CF_3CO -Gruppen ersetzt und man erhält ein reines TFA-Spektrum.

4. Umsetzung mit Triäthylboran

Triäthylboran reagiert mit folgenden funktionellen Gruppen:

- R - OH: alkoholisch (Zucker) und phenolisch (Depside)
- R - COOH: wenn in ortho-Stellung freies OH
- R - CR'O: bei ortho-ständigem OH

Dabei ist sowohl "einzähnige" als auch "zweizähnige" Umsetzung möglich, wenn in einer Kette mehrere OH-Gruppen benachbart vorliegen (Polyole).

Die Derivatisierung erfolgt in Anlehnung an die Vorschrift von R. Köster ⁴⁶⁾ für die Reaktion mit Kohlenhydraten - jedoch ohne Zusatz von Diäthylborpivalat.

Ca. 1 - 2 mg gemahlene Flechte werden unter Stickstoff mit überschüssigem BET_3 (2 ml) umgesetzt. Nach zweitägigem Rühren wird kurz zum Sieden erhitzt und anschließend das Reagenz im Wasserstrahlvakuum abgezogen. Der Rückstand wird sofort vermessen.

Als Nebenprodukt erhält man Triäthylboroxol, das bei niederen Einlaßtemperaturen (20°C) verdampft und Peaks bei m/e 168, 167, 166; 139, 138 (M - Et) und 111, 110 (M - Et - C_2H_4) liefert. Bei höheren Temperaturen, wenn die eigentlichen Inhaltsstoffe erscheinen, ist diese Verbindung bereits wieder verschwunden.

Läßt man die "derivatisierte Flechte" an Luft liegen, so werden die ursprünglichen Metaboliten zurückgebildet; bei der Einwirkung von Trifluoressigsäureanhydrid auf die Borverbindungen erhält man Trifluoracetate, das Bor wird verdrängt.

5. Umsetzung mit Aceton

Die Nützlichkeit der Isopropylidenderivate bei der massenspektrometrischen Identifizierung von Kohlenhydraten wurde zuerst von K. Biemann ⁴⁷⁾ gezeigt.

Da mit dieser Methode Isomere unterschieden werden können, wurde untersucht, ob sie auch auf die Flechtenmassenspektrometrie anwendbar ist.

Etwa 2 mg zerriebene Flechte werden mit 2 ml Aceton/1% H_2SO_4 versetzt. Man läßt über Nacht rühren, neutralisiert mit KOH-Lösung, saugt den gebildeten Niederschlag ab und dampft die klare Lösung ein. Der so erhaltene Rückstand wird gemessen.

Man findet jedoch bei diesem Verfahren im Spektrum nur wenig intensive Peaks im unteren, ungünstigen Massenbereich. Um dem abzuhelpen, wurde versucht, die im Arabit nach zweifacher Umsetzung noch freie OH-Gruppe mit $(\text{CF}_3\text{CO})_2\text{O}$ reagie-

ren zu lassen, um dadurch zu höheren Massenzahlen zu kommen. Dabei werden jedoch alle Isopropylidenliganden durch die TFA-Gruppe ersetzt. Auch der umgekehrte Weg - zuerst Tri-fluoracetylierung und dann Isopropylidierung - ist nicht gangbar, da keine Reaktion stattfindet.

Nach Zugeben von definierten Wassermengen zum Gemisch aus Arabit-TFA, Aceton und Schwefelsäure erhält man zwar eine Umdervatisierung, aber es entsteht keine einheitliche Verbindung.

6. H/D-Austausch

Die Umsetzung mit D_2O wurde genauso wie die oben beschriebenen Derivatisierungsmethoden (Einwirkung über Nacht, Abdampfen des Reagenzes) an der Gesamtflechte durchgeführt, um die Anzahl der sauren H-Atome zu bestimmen.

Dies kann bei der Unterscheidung isomerer Verbindungen von Nutzen sein.

Wegen der vielfältigen Möglichkeiten zur Wasserstoffbrückenbindung bei den untersuchten Depsiden und Depsidonen war jedoch nie ein quantitativer Austausch zu beobachten. In vielen Fällen genügt allerdings schon ein nur geringfügig vergrößerter (M+1)-Peak, um beweisend für die eine oder andere Isomerenform zu sein - z.B. bei dem Problem "ungeradzahlige Fettsäure oder Fettsäuremethylester".

7. Hydrierung

Bei der Hydrierung mit Raney-Nickel als Katalysator werden umgesetzt:

Doppelbindungen: in Fettsäuren und Fetten

Halogene: am Aromaten (z.B. Chloratranorin)

Depsidbindungen: der Säureteil ergibt Aldehyd + Alkohol
der Phenolteil liefert ein Phenol

Untersucht wurde in diesem Fall nicht die Reaktion mit Gesamtflechten, sondern nur die Hydrierung einer Petrolätherfraktion, hauptsächlich um die Strukturen von Diglyceriden und langkettigen Fettsäuren abzusichern.

Einige Milligramm gemahlene Flechte oder Extrakt werden nach Zugabe von ca. 2 ml n-Pentan mit frischem Raney-Nickel versetzt und unter stetem Rühren bei leichtem Wasserstoffüberdruck hydriert. Wird kein H_2 mehr aufgenommen, hebert man die Lösung ab und dampft sie ein.

Sollen polarere Verbindungen (Depside) untersucht werden, kann auch Methanol als Lösungsmittel verwendet werden.

III. Anreicherung

Oftmals reichen die Konzentrationen einzelner Verbindungsklassen nicht aus, um noch im Flechtenmassenspektrum eindeutige Peaks zu ergeben, so daß Anreicherungsverfahren angewendet werden müssen.

Zur qualitativen Erfassung auch kleinster Substanzmengen eignet sich dabei die schon früher beschriebene Mikro-Extraktionsmethode, bei der es genügt, wenige Milligramm Flechte zu verwenden, um noch eindeutige Ergebnisse zu erzielen. 48)

Weiterhin wurden auch größere Mengen (ca. 50 g) Flechte extrahiert, sowie Untersuchungen über die Sublimierbarkeit durchgeführt.

1. Extraktionen

Bei "Makro-Extraktionen" wurde eine Soxhletapparatur mit einem Fassungsvermögen für ca. 2 l Lösungsmittel verwendet. Die Gewichtsmenge der untersuchten Flechten lag zwischen 29 und 64 g.

Quantitative Bestimmungen der extrahierten Stoffe wurden nicht durchgeführt, da es zur Chemotaxonomie unwesentlich ist, wieviel von einer bestimmten Substanz synthetisiert wird. Wichtig ist nur, ob die Geninformation prinzipiell vorhanden ist; die Menge ist dann nur eine Frage der Lebensbedingungen.

Besonderes Augenmerk ist auf die Reinheit der Lösungsmittel zu richten. Aber auch durch "Extraktion" der Soxhlethülse können Verunreinigungen eingeschleppt werden - vgl. dazu die Arbeiten von G. Spiteller et al. ⁴⁹⁾⁵⁰⁾ über die "Inhaltsstoffe" von Filterpapieren.

Die Ergebnisse der vorgenommenen Extraktionsversuche sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

2. Sublimation

Die Sublimation wurde nur im Mikromaßstab an ca. 5 mg Flechte untersucht.

Bemerkenswert ist vor allem die mögliche Trennung von Diglyceriden und Triglyceriden.

Tabelle 2 zeigt die verschiedenen Temperaturbereiche und die zugehörigen Verbindungsklassen. Man erkennt, daß neben dieser "Vortrennung" eine weitere Aufspaltung im Massenspektrometer durch Variation der Einlaßtemperatur möglich ist.

Tabelle 1

Extr. USNEA	PARMELIA	PLATISMATIA	PSEUDEVERNIA	CETRARIA	CLADONIA
chaetophora	taractica	glaucia	furfuracea	islandica	tenuis
I.1. Usninsäure	Usninsäure	Fumarprotocetrarsäure Physodsäure 4-O-Methylphysodsäure 3-Hydroxyphysodsäure Caperatsäure	Atranorin Chloratranorin		
I.2. Usninsäure					
Methylusninsäure					
Demethylusninsäure					
Dihydroxyformyl-					
Dihydroxymethyl-					
Trihydroxymethyl(?)phthalid					
Ergosterin					
Cholesterin					

Extr. USNEA	PARMELIA	PLATISMATIA	PSEUDEVERNIA	CETRARIA	CLADONIA
chaetophora	tartactica	glauca	furfuracea	islandica	tenuis
I.3.	Usninsäure	Usninsäure	Atranorin		
	Methylusnin- säure	Methylusnin- säure	Chloratranorin		
	Demethylusnin- säure	Demethylusnin- säure	Vorstufen		
	Ergosterin		Caperatsäure		
	Zeaxanthin				
	Fette				
I.4.	C ₂₀ H ₃₂	Ergosterin-gr.	Usninsäure		
	Fettsäuren	α-Tocopherol			
	Fettalkohole	Cholesterin			
	Fette	Äthylcholesta- dienol			
	Ergosterin-gr.	β-Sitosterin			
	β-Sitosterin	Fettsäuren			
	α-Tocopherol	Fette			
	Usninsäure	Usninsäure			
	Methylusnin- säure				
	Demethylusnin- säure				

Extr.	USNEA	PARMELIA	PLATISMATIA	PSEUDEVERNIA	CETRARIA	CLADONIA
	chaetophora	taractica	glauca	furfuracea	islandica	tenuis
II.1.	Stictinsäure	Stictinsäure		Pentit	Fumarproto- cetrarsäure	Fumarproto- cetrarsäure
	Norstictin- säure	Norstictin- säure		Hexit (Sp.)	Wachse	Hypoprote- cetrarsäure
	Salazinsäure	Salazinsäure		Tetrahydroxy- fettsäuren	Ergosterin(Sp.)	cetrarsäure
	Vorstufen	Fette		Tetrahydroxy- fettsäureester	Protolicheste- rinsäure (Sp.)	Virenssäure
	Tetrahydroxy- fettsäuren				Pentit	Pentit
	Tetrahydroxy- fettsäureester					Tetrahydroxy- fettsäuren
	Fettsäuren					Tetrahydroxy- fettsäureester
	Dihydroxy- methyl-					
	Dihydroxy- formyl- phthalid					
	Pentit					
II.2.	Usninsäure					
	Dihydrousnin- säure (?)		Fumarproto- cetrarsäure			
	Dihydroxy- methylphthalid		Hypoprote- cetrarsäure (Sp.)			
	Dihydroxy- formylphthalid					

Extr.	USNEA chaetophora	PARMELIA teractica	PLATISMATIA glauca	PSEUDEVERNIA furfuracea	CETRARIA islandica	CLADONIA tenuis
II.3.			Fumarproto- cetrarsäure Hypoproto- cetrarsäure (Sp.) Caperatsäure	Physodsäure 4-O-Methyl- physodsäure 3-Hydroxy- physodsäure Alectoron- säure Hydroxyalecto- ronsäure Depsidon 2 Tridepsidone Vorstufen Fette Pentit Hexit u.a. Pentit Hexit u.a.	Fette Protolicheste- rinsäure Ergosterin- gruppe u.a.	Uninsäure Demethylusnin- säure Methylusnin- säure u.a.
III.1.						
III.2.						

Extr. USNEA	PARMELIA	PLATISMATIA	PSEUDEVERNIA	CETRARIA	CLADONIA
chaetophora	taractica	glauca	furfuracea	islandica	tenuis

IV.1.

Pentit	Pentit
Hexit	Hexit

V.1. Pentit

Hexose

Polysaccharide

Bei der Extraktionsfolge bedeuten:

- I: Petroläther 1: Niederschlag im Extrakt bei Abkühlung auf Raumtemperatur
 2: Niederschlag bei Kühlung auf 0° C
 3: Niederschlag nach Einengen der Mutterlauge auf halbes Volumen und Kühlung auf 0° C

- 4: Rückstand nach Abdampfen zur Trockene

II: Äther

- 1: Niederschlag im Extrakt bei Abkühlung auf Raumtemperatur
 2: Niederschlag nach Einengen der Mutterlauge auf halbes Volumen
 3: Rückstand nach Abdampfen zur Trockene

III: Methanol

- 1: Niederschlag nach Einengen des Extrakts auf halbes Volumen

IV: Aceton

- 1: Rückstand nach Abdampfen zur Trockene

V: Wasser

- 1: Rückstand nach Abdampfen zur Trockene

Die Extraktionsfolge wurde nicht bei allen Flechten vollständig eingehalten.

Tabelle 2: Mikrosublimation von USNEA chaetophora

Subl.-Bedingungen	Einlaß-Temp. (MS)	sublimierte Verbindungen
100°C/0,2 Torr	25°C	Usninsäure, Fettsäuren, Ergostergruppe, β-Sitosterin, Äthylcholestadienol, -triol
	60°C	zusätzl.: α-Tocopherol, Cholesterin, Demethylusninsäure
	100°C	zusätzl.: Methylusninsäure
150°C/0,2 Torr	105°C	Usninsäure, Demethylusninsäure, Ergostergruppe, α-Tocopherol, β-Sitosterin, Äthylcholestadienol, -triol
	127°C	zusätzl.: Diglyceride
	150°C	idem
170°C/0,1 Torr	25°C	m/e 146
	155°C	Ergostergruppe (thermisch verändert)
	187°C	idem
190°C/0,1 Torr	25°C	-
	110°C	-
	155 - 190°C	Triglyceride, Ergostergruppe (thermisch verändert)

C. MASSENSPEKTROMETRISCHER TEIL

I. Depside

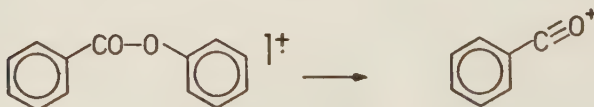
Depside sind flechtenmassenspektrometrisch schwierig zu untersuchen, da sie nur in den seltensten Fällen aus Mischungen heraus (im Gegensatz zu den isolierten Verbindungen) ein Molekülion zeigen, und die gebildeten Fragmente meist mehrere Deutungen zulassen.

Hinzu kommt, daß in den Flechten sehr oft eine Anzahl ähnlicher Verbindungen nebeneinander vorliegen, die dann Anlaß zu "homologen" Bruchstücken geben und dadurch die Interpretation erschweren.

Wohl aus diesen Gründen erwähnt Santesson nur nebenbei, daß Atranorin an seinen charakteristischen Fragmenten erkannt werden kann, läßt aber im übrigen diese Verbindungsklasse außer acht.

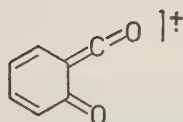
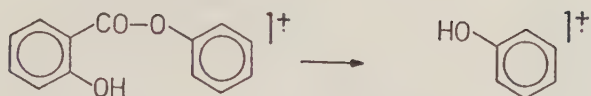
Eine große Hilfe bei der Untersuchung von Depsidspektren ist die Zusammenstellung von S. Huneck et al. ⁵¹⁾.

Depside fragmentieren prinzipiell unter Spaltung der Esterbindung:



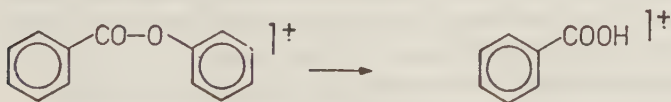
Befindet sich in ortho-Stellung zur Säuregruppe, kein Substituent mit abstrahierbarem H-Atom (wie es z.B. beim Benzoesäurephenylester der Fall ist), so wird die positive Ladung nur vom Acyliumion übernommen, und der Phenolteil bleibt unsichtbar. Bei einer ortho-Hydroxylgruppe dagegen kann das Wasserstoffatom sehr leicht auf den Phenolteil übertragen werden, der dann ebenfalls die positive Ladung stabilisiert. Allerdings kann in diesem Fall auch der Säu-

reteil noch auftreten.



Die relativen Intensitäten der drei möglichen Depsidbruchstücke hängen ab von den übrigen Substituenten des Moleküls. Wird die ortho-OH-Gruppe durch Methylierung oder Acetylierung blockiert, so verschwindet naturgemäß der Phenolteil wieder, da kein übertragbarer Wasserstoff mehr vorhanden ist.

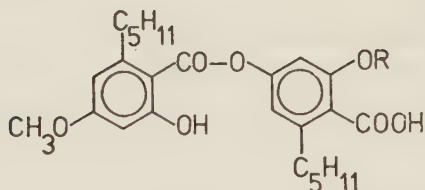
Die dritte, von J. A. Elix ⁵²⁾ zuerst für Perlatolsäure vorgeschlagene Fragmentierungsart:



bei der die freie Säure zurückgebildet werden soll, konnte an Hand der von J. A. Elix selbst verwendeten Originalsubstanzen widerlegt werden.

Abb. 2 zeigt das Massenspektrum der von diesem Autor synthetisierten 2'-O-Methylperlatolsäure ab m/e 400 bei einer Einlaßtemperatur von 120°C. Man erkennt folgende Peaks:

m/e 458 (M), 441 (M - OH), 440 (M - H₂O), 414 (M - CO₂)



R = H:	m/e 444	Perlatolsäure
R = CH ₃ :	m/e 458	2'-O-Methylperlatolsäure

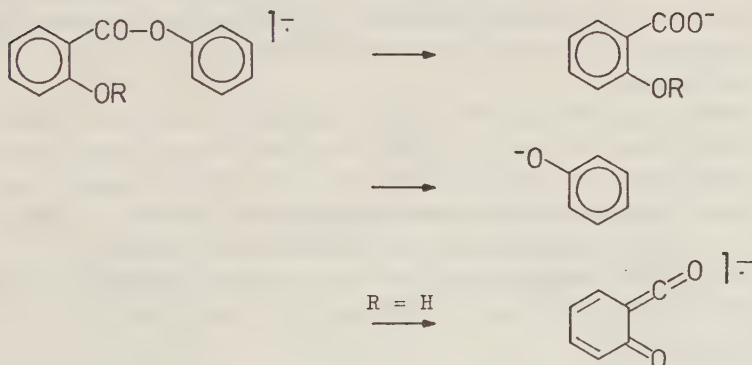
In Abb. 3 ist das Spektrum der synthetischen Perlatolsäure bei derselben Temperatur ab m/e 400 dargestellt. Die beiden "homologen" Peaks bei m/e 400 und 414 können nicht von ein und derselben Verbindung stammen, es sind vielmehr die beiden Decarboxylierungsprodukte von Perlatolsäure und 2'-O-Methylperlatolsäure. Im unteren Massenbereich findet man entsprechend m/e 224 und 238, die beiden Phenolbruchstücke. Es liegt also bei der vermeintlichen "Perlatolsäure" eine Mischung aus Perlatolsäure und 2'-O-Methylperlatolsäure vor. Da J. A. Elix selbst bei seiner Messung die Molekülionen bzw. ihre Decarboxylierungsfragmente nicht beobachten konnte, mußte er die Existenz des Peaks bei m/e 238 mit dem oben beschriebenen Zerfall deuten. Unabhängig von dieser Problemstellung muß man aus Abb. 3 den Schluß ziehen, daß bei Gemischen Decarboxylierungen wesentlich leichter stattfinden als bei Einzelverbindungen. Diese Beobachtung machte J. Santesson ⁵³⁾ auch bei Gesamtflechtenspektren.

Betrachtet man allgemein den Temperaturverlauf der thermischen Spaltungsmöglichkeiten bei 2'-O-Methylperlatolsäure, so findet man nachstehende Reihenfolge:

100°C: Decarboxylierung	(M - CO ₂ : 62% von M)
122°C: Decarboxylierung	(M: 4% von M - CO ₂)
H ₂ O-Abspaltung	(M - H ₂ O: 42% von M)
150°C: Decarboxylierung	(M: 2,7% von M - CO ₂)
H ₂ O-Abspaltung	(M: 1,7% von M - H ₂ O)

Mit zunehmender Einlaßtemperatur findet also ein Übergang von der Decarboxylierung zur Dehydratisierung statt. Dasselbe beobachtet man bei Perlatolsäure, obwohl dort die H₂O-Abspaltung wegen der freien 2'-OH-Gruppe wesentlich leichter möglich sein sollte.

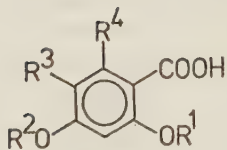
Bei Spektren negativer Ionen findet man folgende Fragmentierungen:



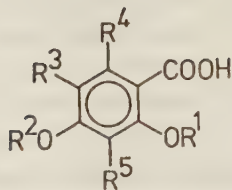
Auch hier hängen die relativen Intensitäten wieder von den übrigen Substituenten ab.

Vergleicht man Elektronenstoßspektren mit Elektronenanlagerungsspektren, so tritt in vielen Fällen eine gewisse gegenseitige Ergänzung auf, indem jeweils eine andere Spaltungsart bevorzugt wird. Spektren negativer Ionen liefern häufiger ein Molekülion als Spektren positiver Ionen.

Depside werden gebildet durch intermolekulare Veresterung von Säure- und Phenolteil. Man unterscheidet zwei Grundklassen: Derivate vom Orcintyp und vom β -Orcintyp.



Orcintyp



β-Orcintyp

Beim β-Orcintyp befindet sich in 3-Stellung des aromatischen Rings ein Substituent R^5 mit einem mehr oder weniger oxidierten C-Atom ($-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CHO}$, $-\text{COOH}$). Die beiden Grundklassen werden weiter unterteilt nach der Stellung der veresterten OH-Gruppe relativ zur freien Carboxylgruppe in meta- und para-Depside.

Obwohl die Art der Biosynthese aus Säure- und Phenolteil schon lange bekannt ist und obwohl man immer wieder diese Vorstufen auch isolieren konnte, wurde ihr Vorkommen bis heute durch Zersetzung der eigentlichen Depside - schon in der Flechte oder während der Extraktion - erklärt ⁵⁴⁾.

Der flechtenmassenspektrometrische Nachweis dieser Vorstufen wäre ein unabhängiger Beweis für ihre Existenz.

1. Atranoringruppe

Atranorin ist wegen seiner weiten Verbreitung eines der am längsten bekannten Depside. Unter den hier massenspektroskopisch untersuchten Flechten enthielten allein sechs diese Verbindung:

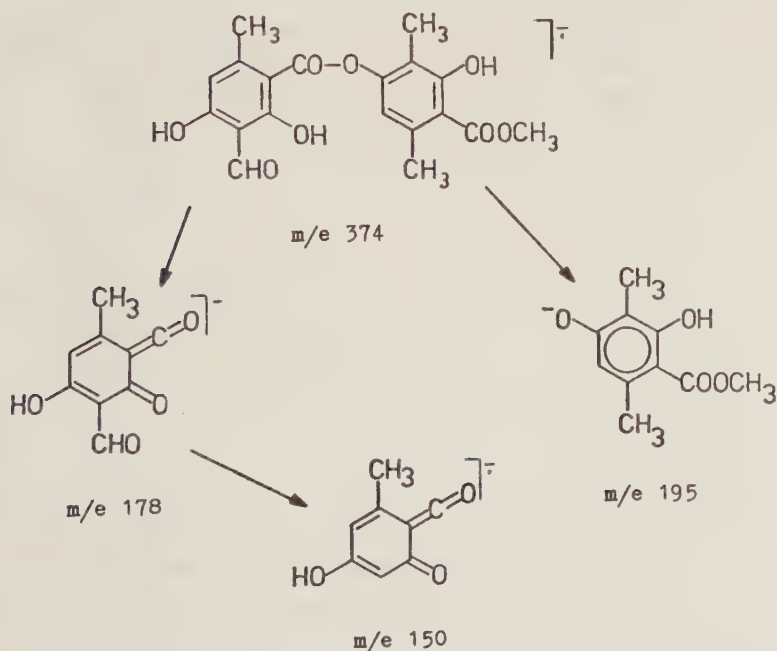
Cladonia mediterranea
Cladonia rangiferina
Parmelia taractica
Platismatia glauca

Pseudevernia furfuracea
Stereocaulon vesuvianum

Abb. 5 zeigt das Flechtenmassenspektrum von PSEUDEVERNIA furfuracea (L.) Zopf bei 95°C Einlaßtemperatur.

Man erkennt die im Fragmentierungsschema (Schema 1) dargestellten Peaks von Atranorin (m/e 374, 179) sowie von Chloratranorin (Peaks bei m/e 408, 213/215, 185). Das Signal bei m/e 210 ist "homolog" zu m/e 196, muß also eine zusätzliche Methylgruppe enthalten.

In Abb. 4 ist ein Spektrum negativer Ionen der Flechte CLADONIA mediterranea dargestellt. Wie man Schema 2 entnehmen kann, tritt hier fast nur das Säure-Bruchstück auf, während bei Elektronenstoßspektren der Phenolteil und seine Folge-Ionen die intensivsten Peaks liefert.



Schema 2: Atranorin (negative Ionen)

CC1=C(R)C(=O)C(=O)C(O)=C1O
$$\frac{-H_2}{K}$$
CC1=C(C(=C(C=C1)O)O)C(=O)OC
$$-\text{CH}_3\text{OH}$$
CC1=C(R)C(=O)C(O)=C(O)C1

m/e 163

CC1=C(C)C(=O)C(=O)C(O)=C1

1	CO
---	----

m/e 135

-H.

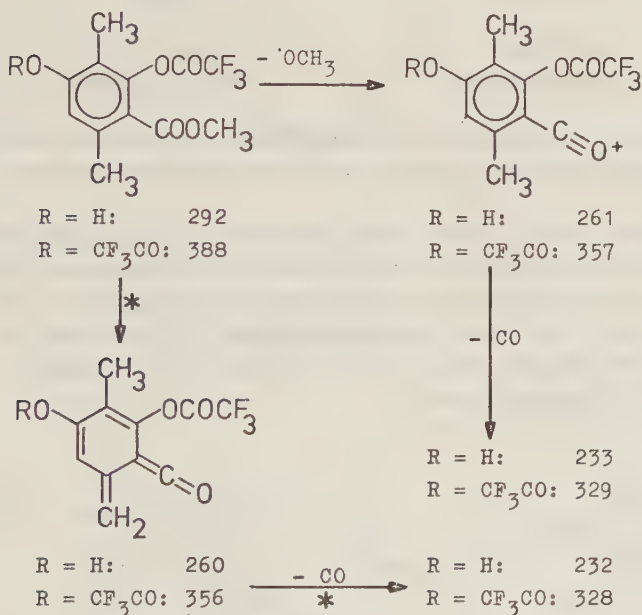
m/e 136

- CO

m/e 108

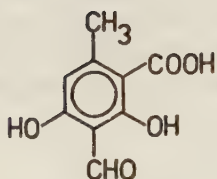
Schema 1: Atranorin (R = H)
Chloratranorin (R = Cl)

Setzt man eine der oben genannten Flechtenspecies mit Tri-
fluoressigsäureanhydrid um, so findet man neben überwiegen-
den Kohlenhydratpeaks (vgl. Abschnitt VIII) das Molekülion
für einfach trifluoracetyliertes Atranorin bei m/e 470, so-
wie den einfach und zweifach umgesetzten Phenolteil mit
seinen Fragmenten:

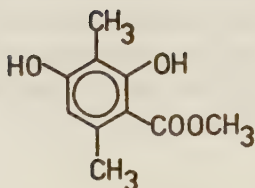


Der Schluß, daß es sich bei dem doppelt derivatisierten
Phenolteil um die als solche in der Flechte vorhandene Vor-
stufe handeln muß, ist auf Grund der mit Trifluoressig-
säure möglichen Depsidspaltung nicht zulässig.

Da bei Atranorin Phenolteil und Säureteil auf dieselbe
Massenzahl fallen und die Phenolvorstufe zudem noch massen-
spektrometrisch sehr leicht gebildet wird, wurden weitere
Methoden zur Unterscheidung der beiden Isomeren gesucht.



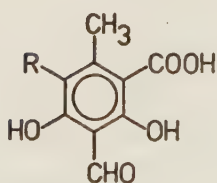
m/e 196
Säurevorstufe



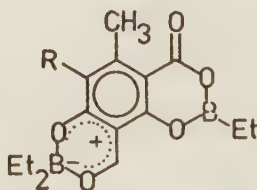
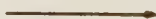
m/e 196
Phenolvorstufe

Abb. 7 zeigt das Spektrum von PSEUDEVERNIA furfuracea nach der Umsetzung mit Triäthylboran bei einer Einlaßtemperatur von 130°C.

Das Spektrum enthält neben nicht veränderten Ausgangsverbindungen die derivatisierten Säurevorstufen von Atranorin und Chloratranorin, erkenntlich an der Fragmentierung sowie am typischen Bor- bzw. Bor/Chlor-Isotopenmuster. Die Peaks der chlorhaltigen Species zeichnen sich außerdem durch einen negativen Massendefekt aus.



R = H: 196
R = Cl: 230/232

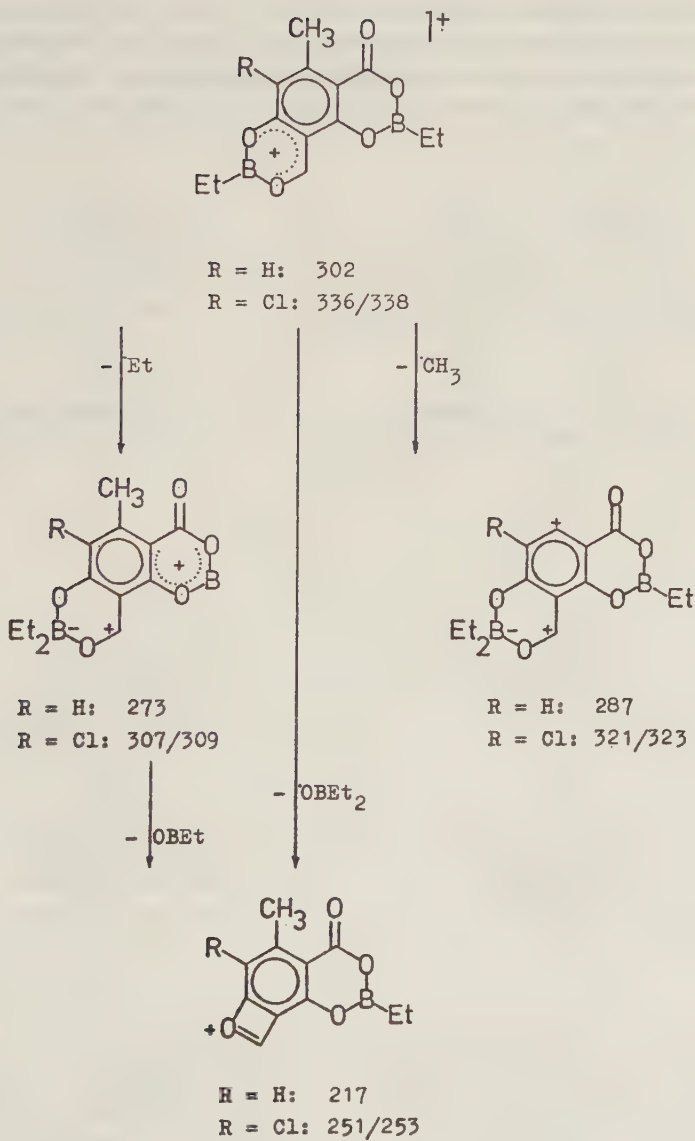


R = H: 302
R = Cl: 336/338

Die Fragmentierung dieser Verbindungen ist Schema 3 zu entnehmen.

Zur Anreicherung der Biosynthesestufen wurden Extraktionsversuche durchgeführt.

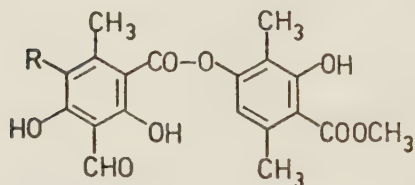
In Abb. 6 ist die dritte Petrolätherfraktion (vgl. Tabelle 1)



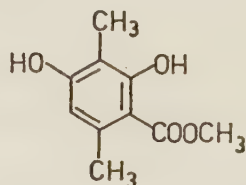
Schema 3: Mit BET_3 derivatisierte Säurevorstufen von Atratinorin ($R = H$) und Chloratranorin ($R = Cl$)

von *PLATISMATIA glauca* (L.) W. et C. Culb. bei einer Eintrittstemperatur von 130°C dargestellt.

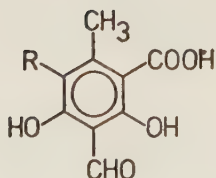
Man kann neben nicht vollständig abgetrennten Verbindungen aus der zweiten Petrolätherfraktion folgende Atranorinstufen erkennen:



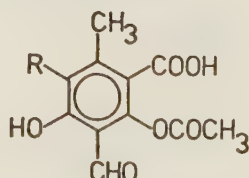
R = H: 374 Atranorin
R = Cl: 408/410 Chloratranorin



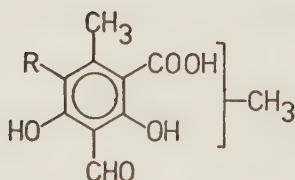
m/e 196
Phenolvorstufe



R = H: 196
R = Cl: 230/232
Säurevorstufe

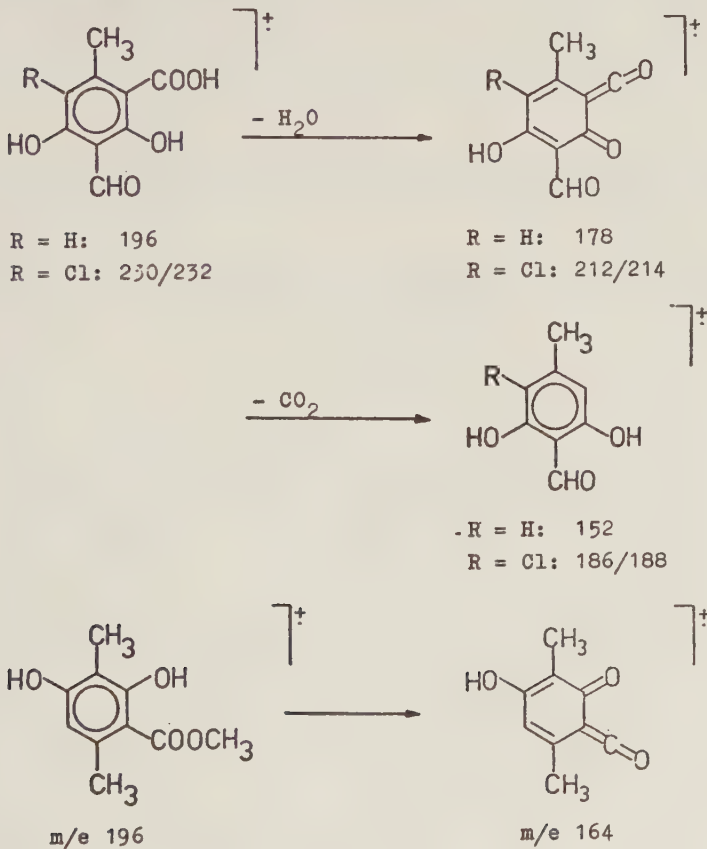


R = H: 238
R = Cl: 272/274
acetylierte Säurevorst.



R = H: 210
R = Cl: 244/246
"homologe" Säurevorstufe

Verringert man bei der Aufnahme des Massenspektrums die Elektronenenergie auf 10 eV, so sind nur noch thermische Fragmentierungen möglich (H_2O -, CH_3OH -, CO_2 -Abspaltung) und man erhält Abb. 8.

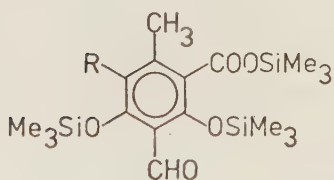


Bei 13 eV Elektronenenergie überwiegen zwar immer noch die thermischen Reaktionen, aber es treten bereits auch massenspektrometrische Abbauten auf. Für den Übergang m/e 196 m/e 164 scheint diese Energie gerade so eingestellt zu sein,

daß nahezu alle Zerfälle im feldfreien Raum stattfinden und man einen sehr schönen metastabilen Peak bei m/e 137,2 erhält. Wird die Elektronenenergie weiter erhöht, so verlagert sich das Maximum der Fragmentierungen dieses Übergangs sukzessive weiter in Richtung auf die Beschußstelle in der Ionisationskammer hin zu und der metastabile Peak wird kleiner. Im gleichen Maße gewinnen die eigentlichen massenspektrometrischen Peaks an Intensität.

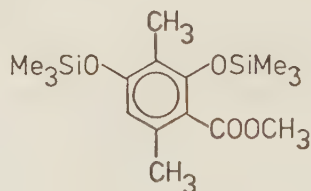
In der vierten Petrolätherfraktion dieser Flechte sind Atranorin und Chloratranorin nicht mehr zu finden, die Vorstufen dagegen treten besonders intensiv auf: Abb. 9.

Zur weiteren Verdeutlichung wurde dieser Extrakt silyliert: Abb. 10 (Einlaßtemperatur 22°C). Man kann an Hand der Fragmentierung ($\text{M} - \text{CH}_3$) und der typischen Isotopenmuster folgende Derivate unterscheiden:

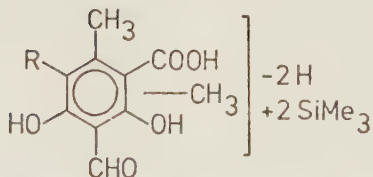


R = H: 412

R = Cl: 446/448

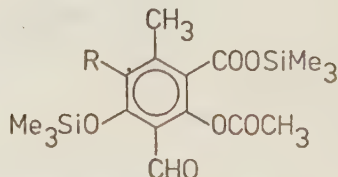


m/e 340



R = H: 354 (?)

R = Cl: 388/390 (?)



R = H: 382

R = Cl: 416/418

Zusammenfassend sollen nun noch einmal die Strukturbeweise für die acetylierten Säurevorstufen beschrieben werden:

- a) keine H_2O -Abspaltung: OH-Gruppe neben der Carboxylgruppe kann nicht frei sein
- b) m^* für m/e 238 $\rightarrow$ 196 und m/e 272 $\rightarrow$ 230: Acetylfunktion
- c) zweimal silylierbar
- d) für ein gemischtes Anhydrid mit Essigsäure ist das Molekölion zu intensiv

Alle oben genannten Verbindungen mit Ausnahme der methylierten Säurevorstufen wurden auch in Extrakten von PSEUDEVERNIA furfuracea gefunden.

Ob die acetylierten Species reaktionsbereite Zwischenstufen (geschützte OH-Gruppe) oder speicherfähige Vorstufen sind, soll hier nicht weiter erörtert werden.

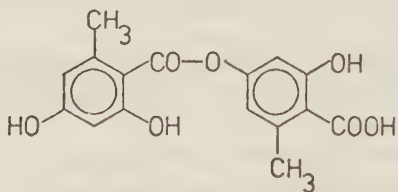
Deuterierungsversuche an der Gesamtflechte zeigten bei PSEUDEVERNIA furfuracea, daß bei Atranorin in der Hauptsache Austausch von 2 H-Atomen - einmal im Säureteil und einmal im Phenolteil - stattfindet, wobei jedoch der Säureteil mit ca. 56% Deuterierungsgrad (gemessen am Peak m/e 179) den Phenolteil mit ca. 36% Deuterierung (an m/e 196) weit überragt.

Methyl- β -orcinolcarboxylat (Phenolvorstufe) wurde bisher nur in PARMELIA tinctorum zusammen mit Atranorin und Chloratranorin ⁵⁵⁾ sowie vor kurzem in PSEUDEVERNIA consocians, hier mit Atranorin gemeinsam ⁵⁶⁾, gefunden.

Die anderen Atranorin- und Chloratranorinvorstufen waren bis jetzt nicht bekannt.

2. Lecanorsäure

Das Flechtenmassenspektrum von *PARMELIA tiliacea* (Hoffm.) Ach. (Abb. 11) zeigt neben den Peaks für Atranorin und Chloratranorin auch Signale, die durch Lecanorsäure hervorgerufen werden:



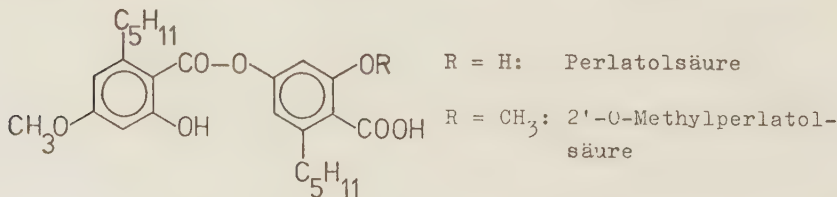
m/e 318

m/e 168 (Phenolteil), m/e 150 (168 - H₂O), m/e 124 (168 - CO₂), m/e 122 (150 - CO), m/e 107 (122 - CH₃) sowie m/e 151 (Depsidspaltung, Säureteil).

3. Perlatolsäure

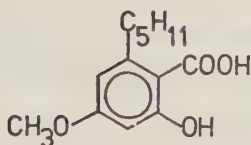
Frühere Untersuchungen ⁵⁷⁾ der Perlatolsäuregruppe sollen hier noch einmal zusammenfassend dargestellt und um die mit den neuen Methoden gewonnenen Ergebnisse erweitert werden.

Im Spektrum von *CLADONIA impexa* findet man neben den Peaks von Perlatolsäure eine Reihe nahezu ebenso intensiver "homologer" Signale, die von 2'-O-Methylperlatolsäure stammen.

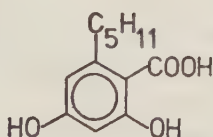


Diese Verbindung, die zuerst dünn-schichtchromatographisch von C. F. Culberson ⁵⁸⁾ in einer Pertusaria-Art nachgewiesen worden war, dann von J. A. Elix ⁵⁹⁾ synthetisiert wurde, konnte nun auch in Substanz von S. Huneck ⁶⁰⁾ aus einer Lecidea-Art isoliert werden.

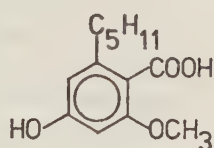
Bei der Trifluoracetylierung der Gesamtflechte stellt man fest, daß m/e 224 zweimal und m/e 238 einmal derivatisierbar ist. Da der Säureteil beider Depside und der Phenolteil von 2'-O-Methylperlatolsäure dieselbe Masse tragen, können diese beiden Isomeren nicht unterschieden werden.



m/e 238
Säureteil beider
Depside .



m/e 224
Phenolteil von
Perlatolsäure

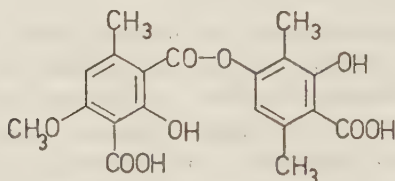


m/e 238
Phenolteil von
2'-O-Me-perl.

Die früher angedeutete Möglichkeit, daß die drei Vorstufen auch in decarboxylierter Form vorliegen, muß auf Grund der schon oben erwähnten Beobachtung, daß in Gemischen Decarboxylierungen besonders leicht vonstatten gehen, revidiert werden.

4. Squamatsäure

Squamatsäure, die ebenfalls schon ausführlich behandelt wurde, kommt vor in CLADONIA squamosa und CLADONIA uncialis.



m/e 390 Squamatsäure

In beiden Flechtenspektren findet man wiederum - wenn auch dieses Mal nur sehr schwach - einen zum Phenolteil (m/e 182) "homologen" Peak bei m/e 196, der von 2'-O-Methylsquamat-säure gebildet wird.

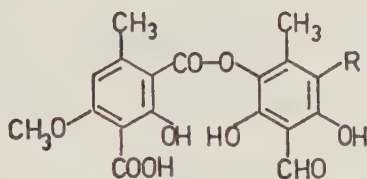
Ob beide, die Squamatsäure bildende Biosynthesestufen auch in freier Form in der Flechte vorkommen, kann nicht mit Sicherheit gesagt werden, da man nach der Trifluoracetylierung nur den Phenolteil an seinem Molekölion (m/e 374) und seinem Decarboxylierungsprodukt (m/e 330) erkennen kann, die Peaks der Säurevorstufe jedoch mit Kohlenhydratpeaks zusammenfallen.

Das früher vermutete Vorhandensein von Decarboxy- und Didecarboxysquamatsäure muß auf Grund der leichten thermischen CO₂-Abspaltung von Depsiden im Gemisch mit anderen Verbindungen in Frage gestellt werden.

5. Thamnolsäure

Thamnolsäure kommt vor - wie schon früher erwähnt - in *CLADONIA digitata*.

Das Molekülion dieser Verbindung ist nicht zu beobachten, man findet nur den Peak des decarboxylierten Produktes bei m/e 376. In diesem Falle muß man jedoch - anscheinend entgegen den oben erwähnten Gründen - auch die Decarboxythamnolsäure als frei in der Flechte vorkommend betrachten, da die Intensität der zugehörigen Peaks wesentlich größer ist als die Erfahrungswerte für rein thermische Zersetzung zulassen.



R = H: 376 Decarboxythamnolsäure

R = COOH: 420 Thamnolsäure

Da man bei m/e 226 den freien Säureteil der beiden Depside erkennen kann, könnte man ebenso folgern, daß auch der Phenolteil in freier Form vorliegt. Hier muß man jedoch beachten, daß der Phenolteil ein massenspektrometrisches Hauptfragment darstellt.

"Homologe" Peaks bei m/e 182 und m/e 196 deuten auf mono- und dimethylierte Formen des Phenolteils der decarboxylierten Species.

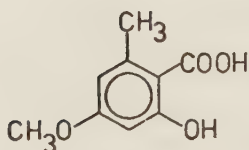
Weitere Betrachtungen über eventuell noch vorhandene Verbindungen sind am reinen Flechtenmassenspektrum wegen der Überlagerung mit Fettsäure- und Lipidpeaks nicht möglich.

6. Peltigerin

Peltigerin oder Tenuiorin, ein Tridepsid, findet man in PELTIGERA horizontalis und PELTIGERA aphthosa.

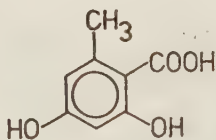
Abb. 12 zeigt das Flechtenmassenspektrum von P. horizontalis bei einer Einlaßtemperatur von 147°C ; die Fragmentierung von Peltigerin folgt aus Schema 4.

Das Molekülion ist erst bei höheren Temperaturen sichtbar, bei gleichzeitiger Intensitätsabnahme der niederen Fragmente. Dies deutet wiederum auf das Vorhandensein von Biosynthesestufen, die bei Peltigerin folgendermaßen aussehen:



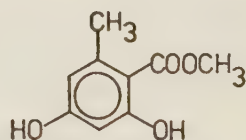
m/e 182

Säureteil



m/e 168

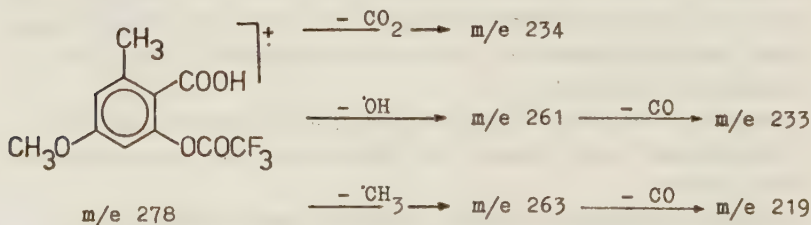
Mittelteil

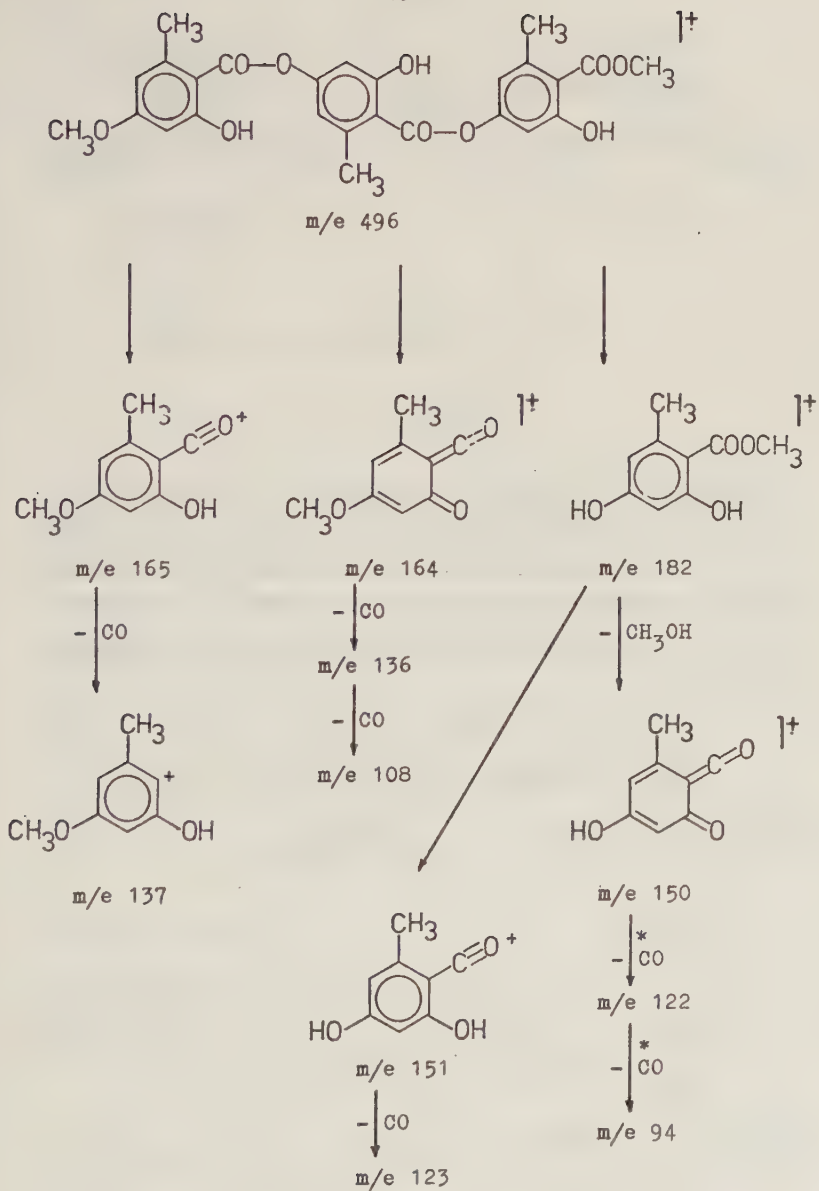


m/e 182

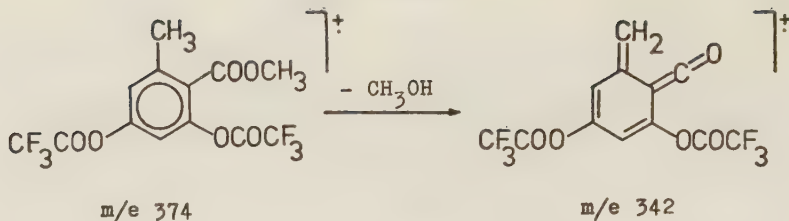
Phenolteil

Trifluoracetyliert man die Gesamtflechte, so findet man im Spektrum (vgl. Abb. 58) den derivatisierten Säure- und Phenolteil, erkenntlich an der charakteristischen Fragmentierung:



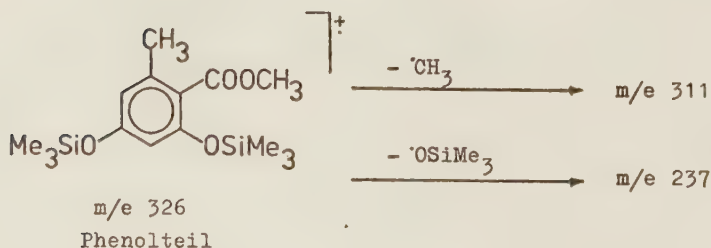
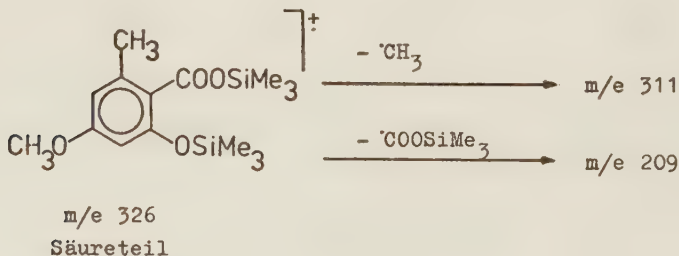


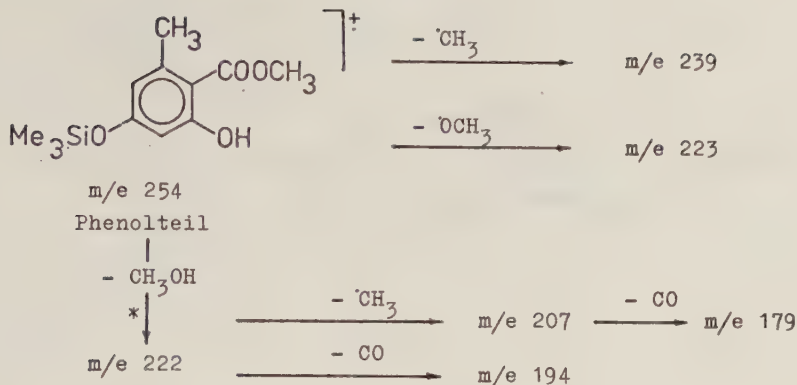
Schema 4: Peltigerin



Einfach trifluoracetylierter Phenolteil, der ebenfalls auftritt, entsteht durch normale Depsidspaltung von Peltigerin-TFA. Der derivatisierte Mittelteil ist nur mit äußerst geringer Intensität im Spektrum gerade noch zu erkennen.

Nach der Silylierung erscheinen bei einer Einlaßtemperatur von 125°C:



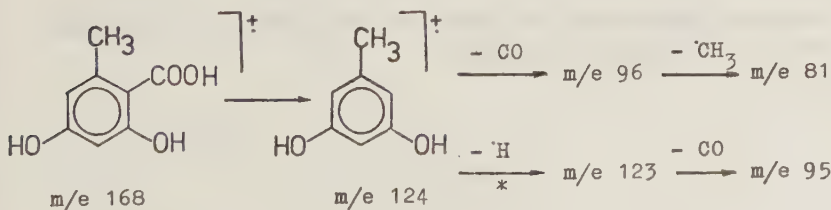


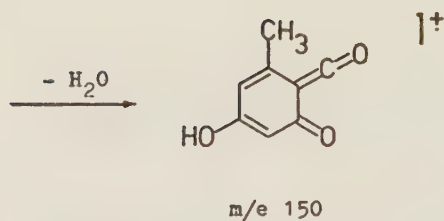
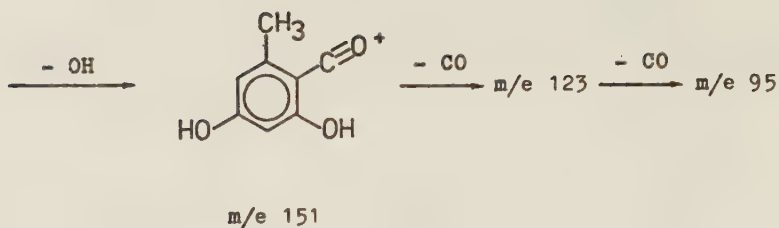
Auch hier fehlt wiederum der Mittelteil. Erhöht man jedoch bei der normalen Flechtenmassenspektroskopie die Einlaßtemperatur auf 210°C, so tritt auch der Mittelteil mit merklicher Intensität hervor.

In den beiden *Peltigera* species *P. canina* und *P. rufescens*, in denen S. Huneck⁶¹⁾ Spuren von Peltigerin dünn-schicht-chromatographisch nachweisen konnte, ist die Konzentration dieser Verbindung anscheinend zu gering, um ohne vorherige Anreicherung im Flechtenmassenspektrum erfaßbar zu sein. Auch W. Zopf⁶²⁾ fand Peltigerin in diesen beiden Arten nicht. Dagegen konnte Y. Solberg⁶³⁾ in jüngster Zeit das Tridepsid aus *Peltigera canina* in kristalliner Form gewinnen.

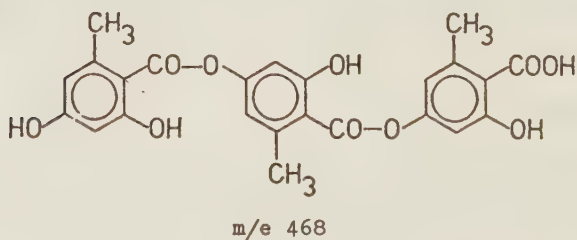
7. Gyrophorsäure

Im Flechtenmassenspektrum von *UMBILICARIA pustulata* findet man die nachstehend mit den zugehörigen Fragmentierungen aufgeführte Verbindung (Orsellinsäure):

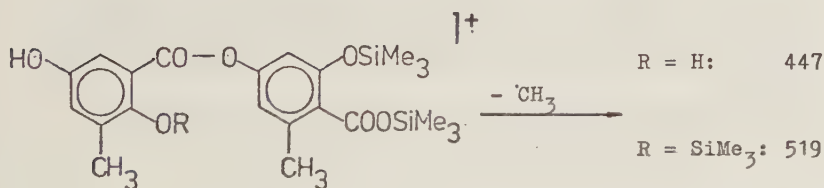
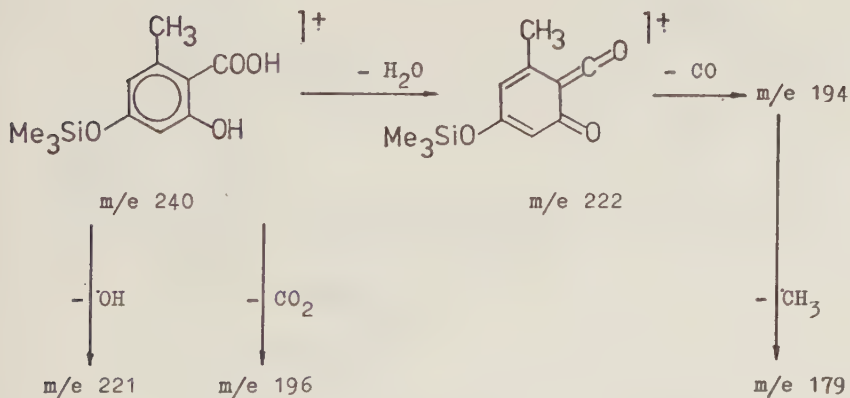
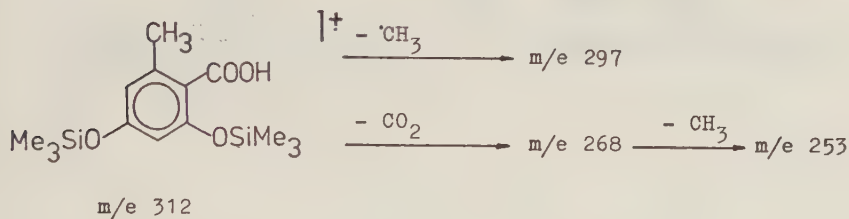
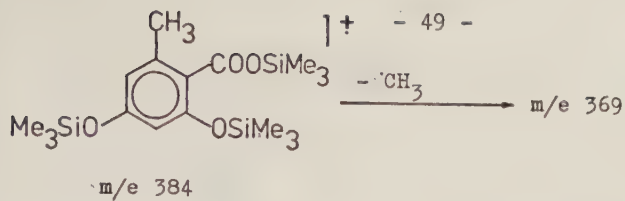




Orsellinsäure kann massenspektrometrisch durch Phenolabspaltung aus Gyrophorsäure gebildet werden:



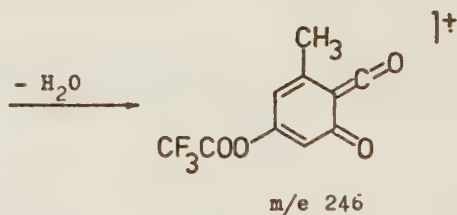
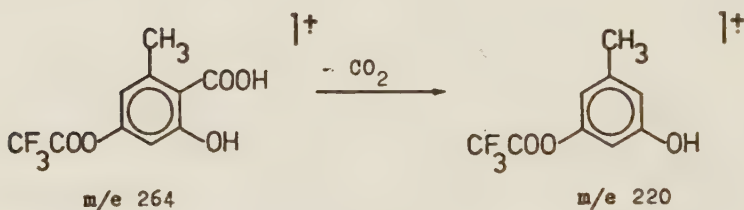
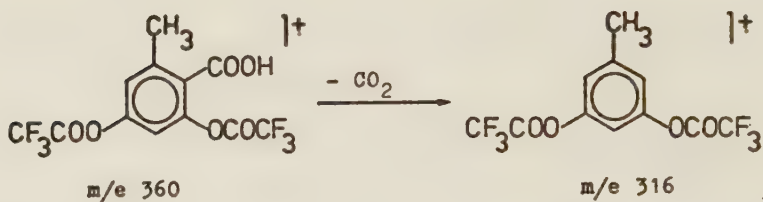
Nach der Silylierung der Gesamtflechte erhält man ein Spektrum mit folgenden Derivaten:



$R = \text{H}: \quad 462$

$R = \text{SiMe}_3: \quad 524$

Die Trifluoracetylierung (vgl. Abb. 57) ergibt:



Die Entscheidung, ob die dimere Verbindung (Lecanorsäure) nur massenspektrometrisch aus Gyrophorsäure entsteht oder in Substanz in der Flechte vorliegt, kann nicht getroffen werden.

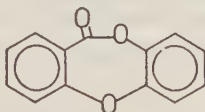
Bisher wurden in *UMBILICARIA pustulata* Gyrophorsäure ⁶⁴⁾ und Lecanorsäure ⁶⁵⁾ gefunden.

II. Depsidone

Über den Mechanismus der massenspektrometrischen Depsidon-fragmentierung ist nur sehr wenig bekannt.

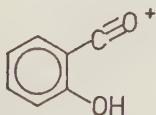
Aus den bis jetzt veröffentlichten Spektren von Depsidonen 66)67)68) kann man nur entnehmen, daß im allgemeinen - im Gegensatz zu den Depsiden - das Molekülion oder Fragmente, die durch Abspaltung einfacher Moleküle wie H_2O oder CO_2 entstehen, die intensivsten Peaks liefern.

Ein Zerfall des Grundsystems

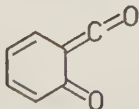


ist nur durch eine zweistufige Reaktion möglich. Solche Fragmentierungen sind energetisch jedoch so ungünstig, daß zuerst alle anderen Möglichkeiten zur Energieabgabe ausgeschöpft werden.

Enthält der Phenolteil ein abstrahierbares H-Atom, so kann das folgende Bruchstück des Säureteils auftreten:



Ist dieser Übergang ungünstig, so findet man:

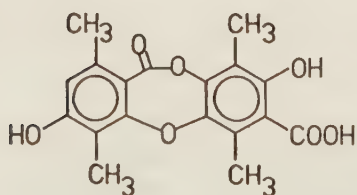


Komplementär dazu erscheint der Phenolteil. Hier kann eine Struktur nicht angegeben werden. Die Intensität der jeweiligen Bruchstücke hängt wieder ab - wie bei den Depsiden - von den übrigen Substituenten des Systems.

1. Fumarprotocetrarsäure

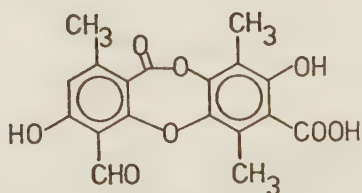
Fumarprotocetrarsäure gibt ein wenig charakteristisches Massenspektrum, da sowohl thermisch als auch durch Elektronenbeschuß sehr leicht Fumarsäure abgespalten wird, die dann bevorzugt die positive Ladung übernimmt, so daß die restlichen Fragmente nur mit sehr geringer Intensität auftreten.

Der in Abb. 14 (1. Ätherfraktion von CETRARIA islandica) zu erkennende und in Schema 5 beschriebene Peak bei m/e 358, den auch J. A. Elix⁶⁹⁾ findet, kann durch eine massenspektrometrische Fragmentierung nicht plausibel erklärt werden. Da zusätzlich noch ein "homologes" Signal bei m/e 344 auftritt, das von Elix nicht beschrieben wird, bleibt nur der Schluß, daß neben Fumarprotocetrarsäure noch zwei andere Depsidone vorhanden sind. Biosynthesemäßig wahrscheinlich sind Hypoprotocetrarsäure und Virensensäure.



m/e 344

Hypoprotocetrarsäure

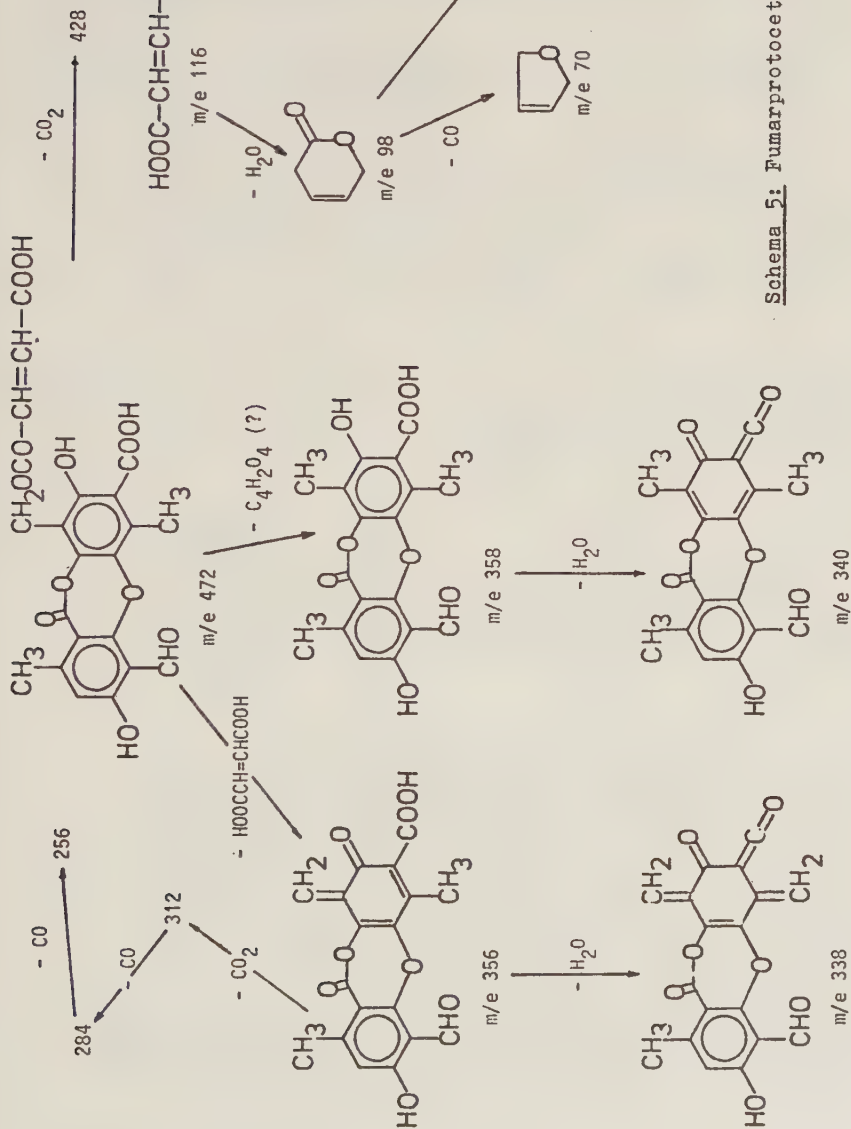


m/e 358

Virensensäure

Die zu erwartenden Fragmente ($M - H_2O$, $M - CO_2$, $M - H_2O - CO_2$) sind zu beobachten.

Die Peakgruppen um m/e 397, 425, 453, 480 und 508 stammen von Estern langkettiger Fettsäuren (Wachse) und werden später besprochen.



Schema 5: Fumarprotocetrarsäure

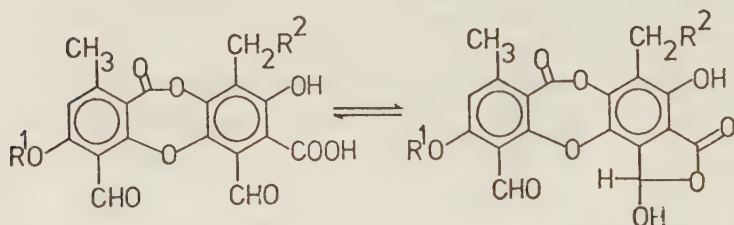
Im folgenden sind diejenigen der untersuchten Flechten aufgezählt, bei denen im Gesamtspektrum auf Grund des starken Auftretens von m/e 116 sowie seiner Folgepeaks auf das Vorhandensein von Fumarprotocetrarsäure geschlossen werden kann:

<i>Cetraria islandica</i>	<i>Cladonia major</i>
<i>Cladonia coniocraea</i>	<i>Cladonia pyxidata</i>
<i>Cladonia furcata</i>	<i>Peltigera aphthosa</i>
<i>Cladonia gracilis</i>	<i>Platismatia glauca</i>

Abb. 13 zeigt als Beispiel einen Ausschnitt aus dem Flechtenmassenspektrum von *CLADONIA furcata* bei einer Einleßtemperatur von 235°C.

2. Stictinsäuregruppe

Vertreter der Stictinsäuregruppe



$R^1 = R^2 = H$	Norstictinsäure	m/e 372
$R^1 = CH_3, R^2 = H$	Stictinsäure	m/e 386
$R^1 = H, R^2 = OH$	Salazinsäure	m/e 388
$R^1 = CH_3, R^2 = OH$	Constictinsäure	m/e 402
$R^1 = H, R^2 = OCOCH_3$	Galbinsäure	m/e 430

kommen unter den hier untersuchten Flechtenarten vor in *USNEA chaetophora* und *PARMELIA taractica*.

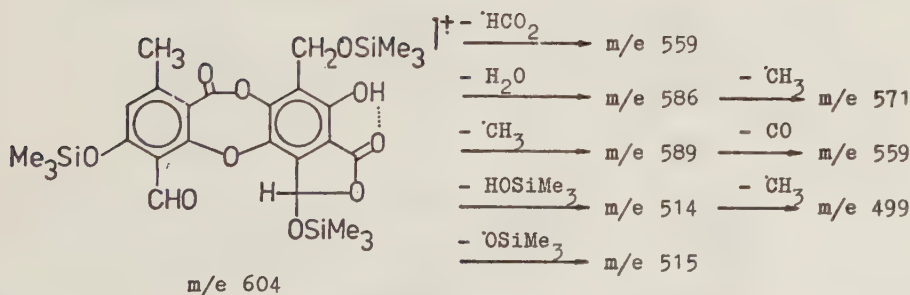
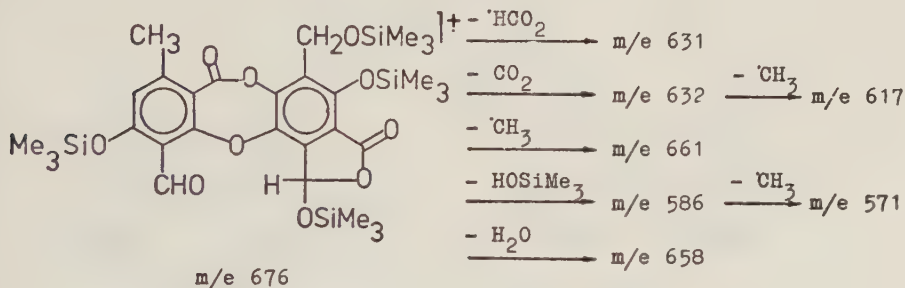
Allerdings sind sie in beiden Fällen erst nach Anreicherung durch Ätherextraktion zu beobachten. Im Gesamtflechtenspektrum finden sich keinerlei Hinweise auf ihre Existenz.

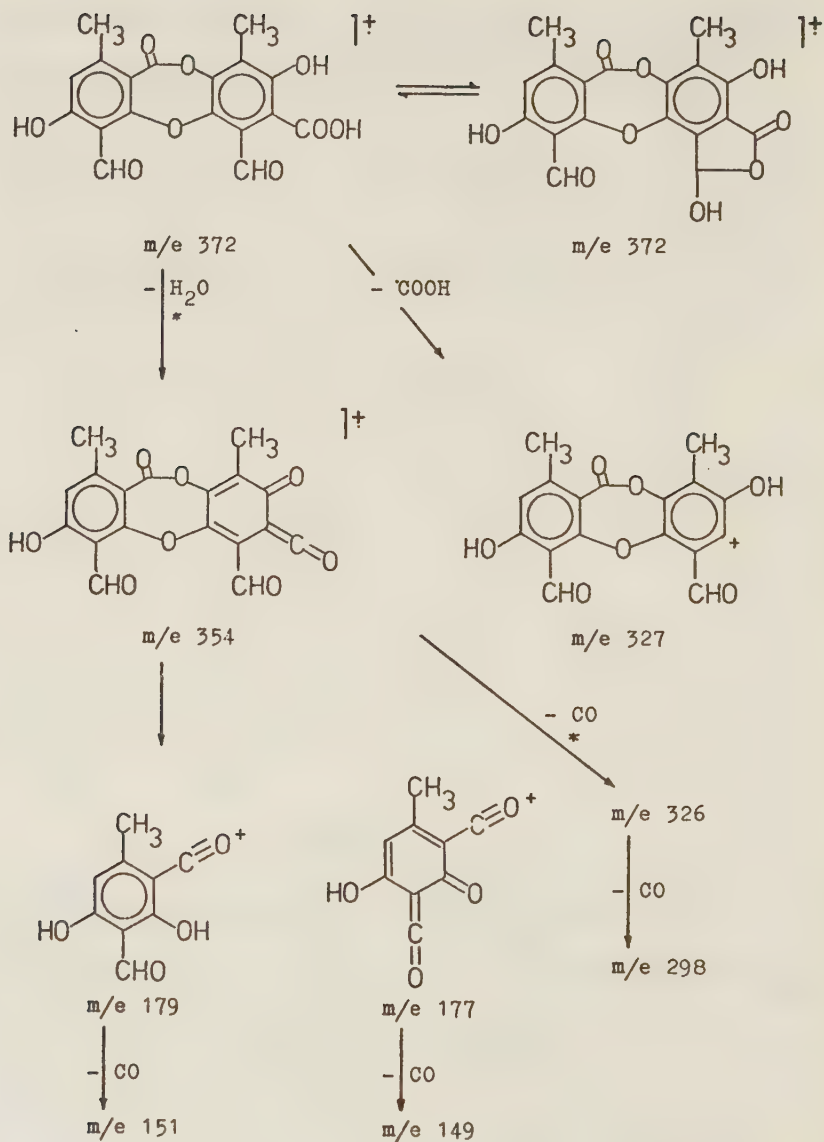
Abb. 15 zeigt das Spektrum der 1. Ätherfraktion der Usnea-Species bei einer Einlaßtemperatur von 170°C .

In Schema 6 ist die Fragmentierung von Norstictinsäure dargestellt.

Man erkennt im Spektrum Norstictinsäure (m/e 372), Stictinsäure (m/e 386) und Salazinsäure (m/e 388) sowie Tetrahydroxyfettsäuren.

Nach der Silylierung findet man bei tiefen Einlaßtemperaturen derivatisierte Zuckeralkohole, bei höheren Temperaturen folgende Produkte:

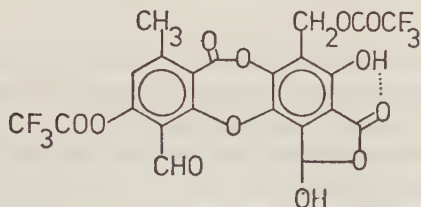




Schema 6: Norstictinsäure

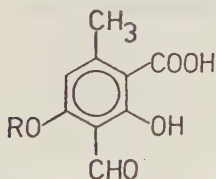
Neben diesen, die Hauptpeaks liefernden Verbindungen treten noch - weniger intensiv - derivatisierte Stufen von Norstictinsäure und Stictinsäure auf.

Nach der Trifluoracetylierung erhält man als stärksten Peak aus der Stictinsäuregruppe m/e 580, zweifach umgesetzte Salazinsäure:



Die dreifach derivatisierte Verbindung findet man ebenfalls mit einem schwachen Signal.

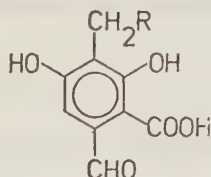
Von den möglichen Vorstufen dieser Depside



R = H: 196

R = CH₃: 210

Säureteil



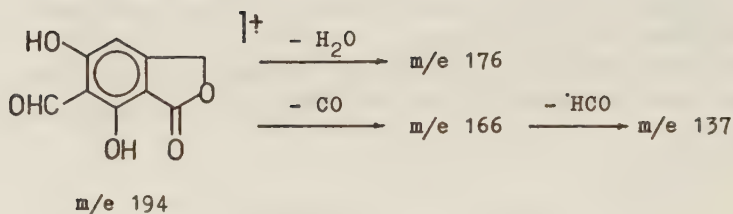
R = H: 196

R = OH: 212

Phenolteil

treten nur die beiden - massenspektrometrisch nicht unterscheidbaren - Isomeren mit m/e 196 auf. Da sie flüchtiger sind als die Depside, genügen schon niedere Einlaßtemperaturen, so daß sie bei 100°C herausfraktioniert werden können.

Als weitere Vorstufe beobachtet man die von Y. Solberg ⁷⁰⁾ in *ALECTORIA capillaris* und *A. nadvornikiana* nachgewiesene Verbindung 5,7-Dihydroxy-6-formylphthalid:



Die Intensitäten der zugehörigen Peaks stimmen mit dem von Solberg beschriebenen Massenspektrum überein.

Die Silylierung dieser Verbindung gelingt an beiden OH-Gruppen und liefert starke Signale bei $m/e \ 323$ ($M - CH_3$), 249 ($M - OSiMe_3$) und 221 ($M - OSiMe_3 - CO$).

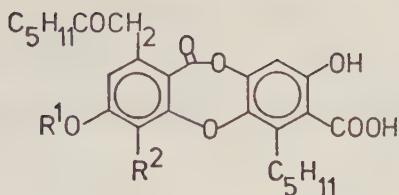
Wegen der in Äther besseren Löslichkeit des Phthalids im Vergleich zu den Depsidonen und ihren Vorstufen kann diese Verbindung in der 2. Ätherfraktion (vgl. Tabelle 1) weiter angereichert werden.

In *PARMELIA taractica* wurden bisher Usninsäure, Norstictinsäure und Stictinsäure in der chemischen Unterart 1, Atranorin, Salazinsäure und Usninsäure in der Unterart 2 gefunden.

3. Physodsäuregruppe

Abb. 16 zeigt das Massenspektrum der 2. Ätherfraktion (vgl. Tabelle 1) von *PSEUDEVERNIA furfuracea* bei einer Einlaßtemperatur von $125^\circ C$.

Man erkennt an den $(M - CO_2)^+$ -Peaks - die Molekülionen sind nicht zu beobachten - folgende Vertreter der Physodsäuregruppe:

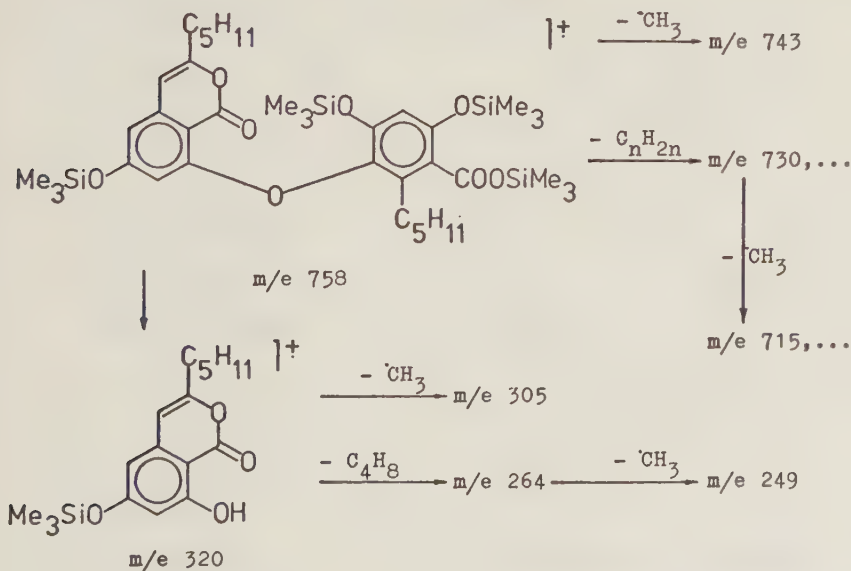


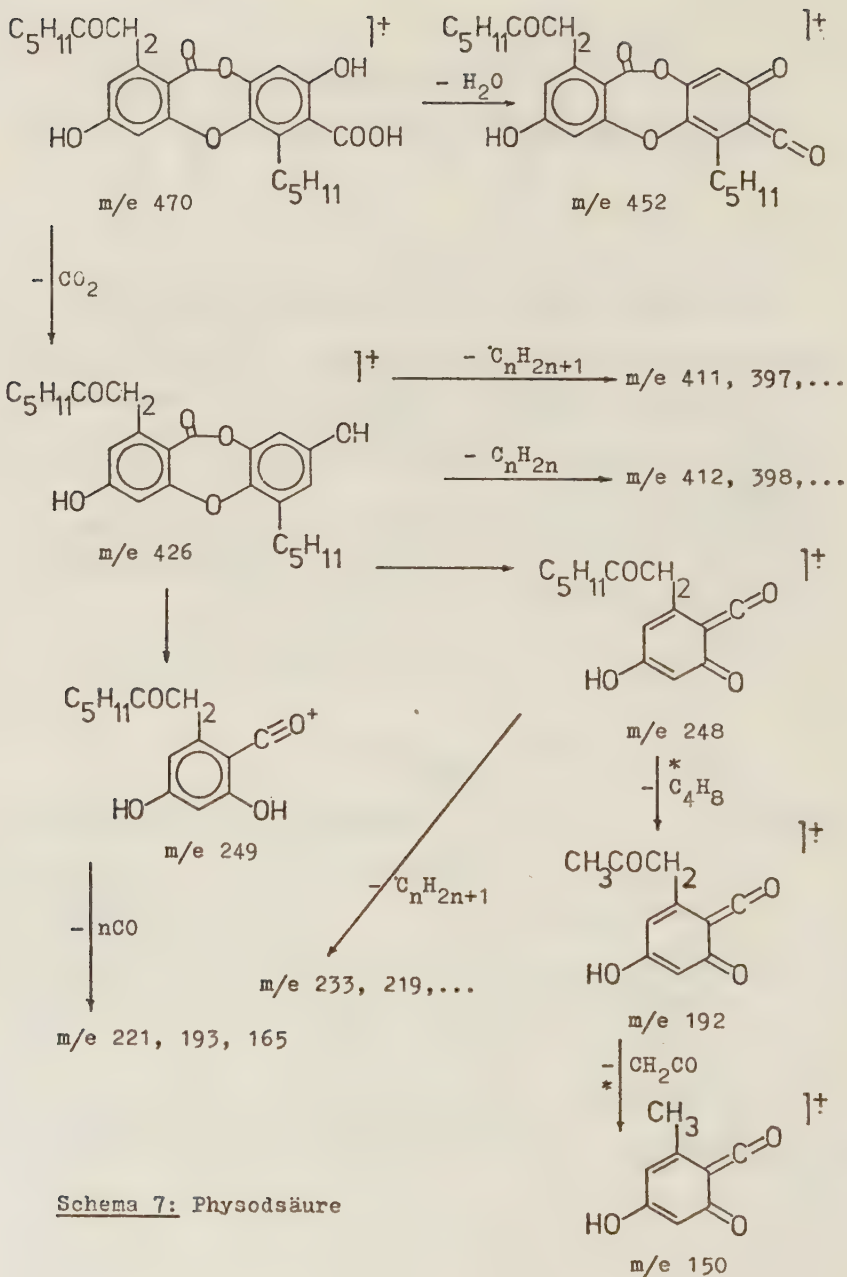
$R^1 = R^2 = H$:	Physodsäure	m/e 470
$R^1 = CH_3, R^2 = H$:	4-O-Methylphysodsäure	m/e 484
$R^1 = H, R^2 = OH$:	3-Hydroxyphysodsäure	m/e 486

Methylierung und Hydroxylierung müssen im Säureteil lokalisiert werden, da auch die zugehörigen Fragmente und Vorstufen (siehe unten) entsprechend substituiert sind.

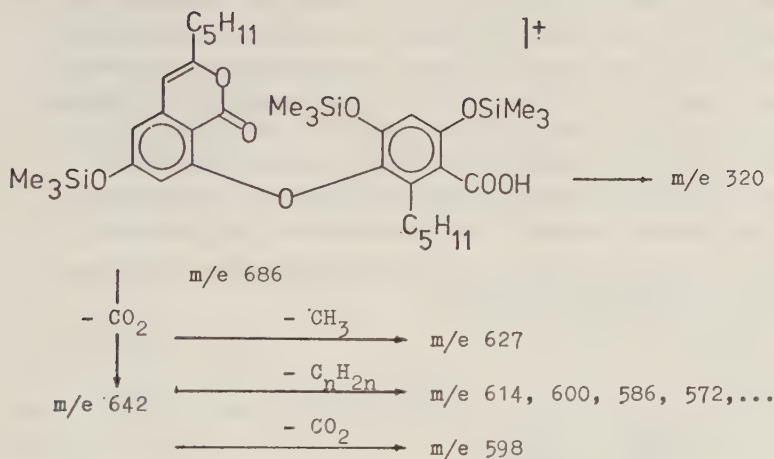
Die Fragmentierung des Grundbausteins Physodsäure ist in Schema 7 dargestellt.

Bei der Silylierung des Gesamtextrakts werden diese Depside unter Mitwirkung der benachbarten $CH_2COC_5H_{11}$ -Gruppe geöffnet und man erhält nachstehende Derivate:





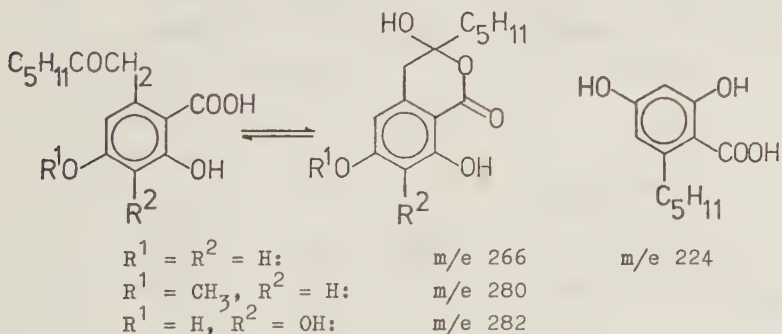
Schema 7: Physodsäure



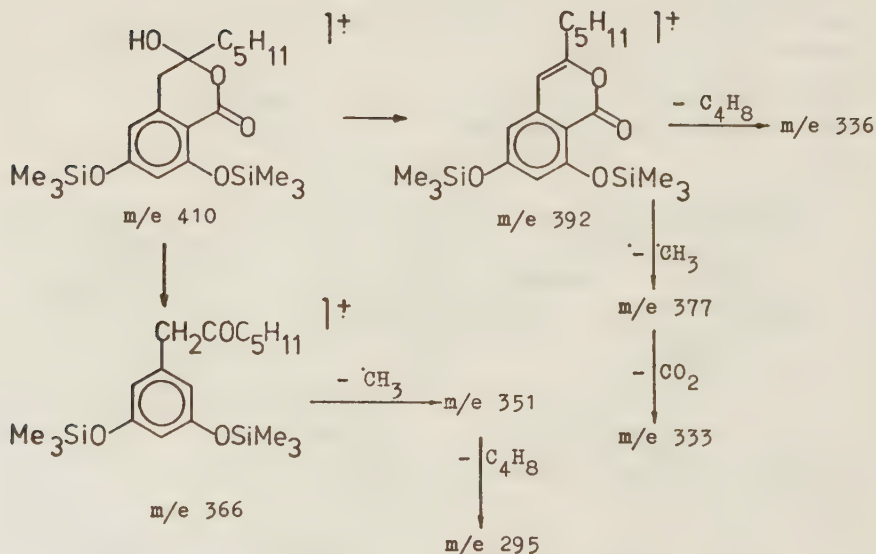
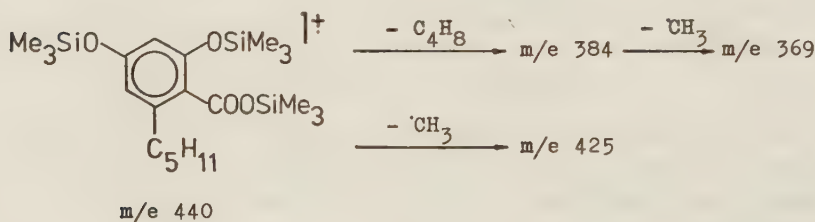
Da die Silylgruppe hydrolytisch sehr leicht wieder abgespalten werden kann - v.a. von Carboxylfunktionen -, ist die letztgenannte Verbindung als Hydrolyseprodukt der vollständig umgesetzten Species anzusehen.

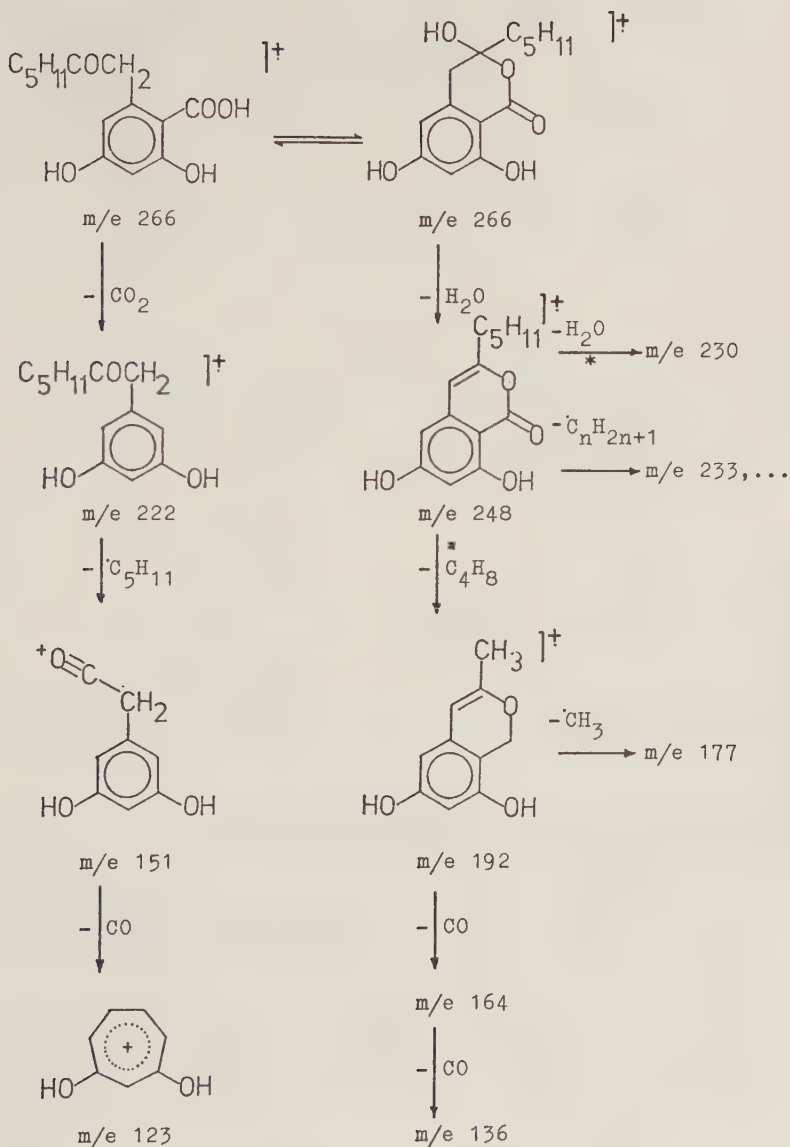
Diese Ringöffnung der Depsidone entspricht der von Y. Asahina ⁷¹⁾ und J. A. Elix ⁷²⁾ beobachteten Spaltung bei der Reaktion mit Diazomethan.

Für die oben genannte Physodsäuregruppe müssen als Vorstufen in Betracht gezogen werden:

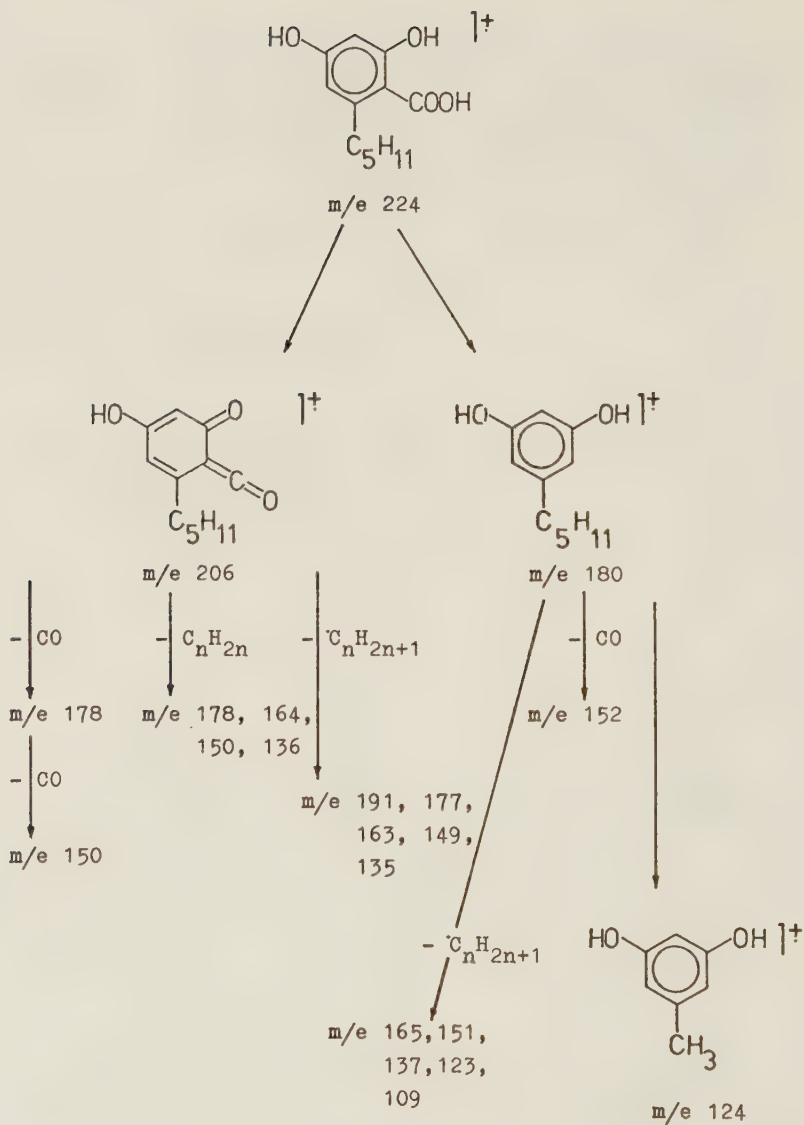


Alle vier Verbindungen sind in Abb. 16 zu finden. Die Säurevorstufen sind an ihren $[M - H_2O]^+$ -Peaks zu erkennen, die in Analogie zu der von J. A. Elix beschriebenen Alecoronsäure⁷³⁾ in ringtautomeren Formen vorliegen. Nur der Phenolteil zeigt ein Molekülion (vgl. dazu Schema 8 und Schema 9). Die genannten Vorstufen sind in der 2. Ätherfraktion (vgl. Tabelle 1) im Vergleich zu den Depsidonen angereichert. In der 3. Fraktion nämlich sind die zugehörigen Peaks wesentlich weniger intensiv. Dort überwiegen die Depsidone. Bei der oben beschriebenen Silylierungsreaktion findet man auch derivatisierte Vorstufen:



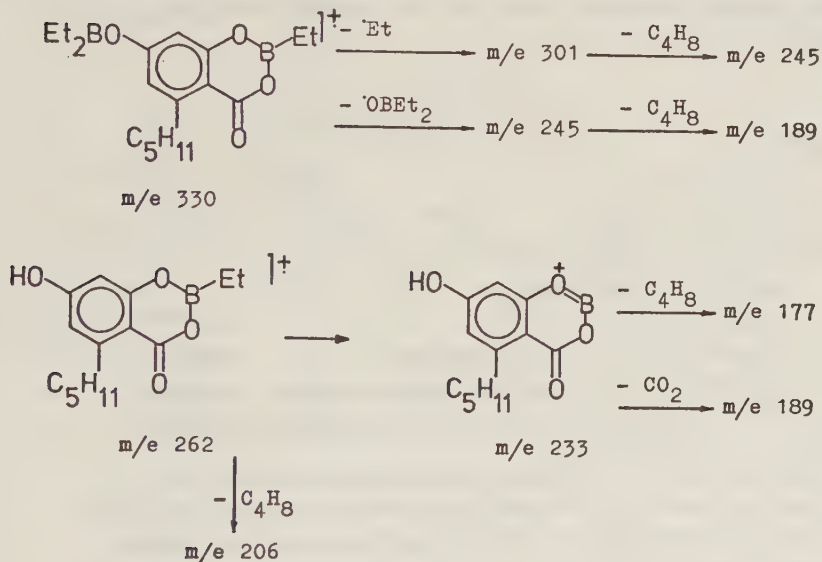


Schema 8: Physodsäurevorstufe (Säureteil)



Schema 9: Physodsäurevorstufe (Phenolteil)

Ähnliche Ergebnisse zeigt die Umsetzung mit Triäthylboran, durchgeführt an der Gesamtflechte:



Bei beiden Derivatisierungsverfahren liefert der Phenolteil die intensivsten Peaks.

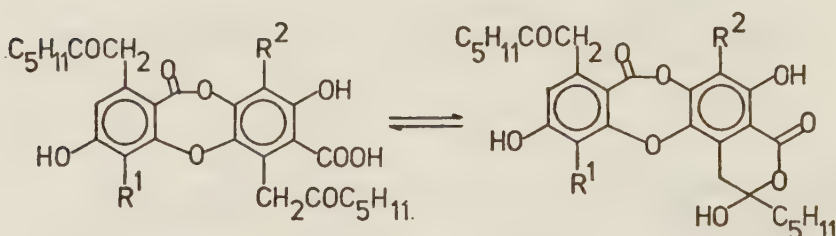
Physodsäure, 4-O-Methylphysodsäure und 3-Hydroxyphysodsäure kommen auch vor in *PLATISMATIA glauca*. Während sie jedoch in *PSEUDEVERNIA furfuracea* in so großer Konzentration vorzuliegen scheinen, daß sie bereits im Gesamtflechtenspektrum zu erkennen sind, müssen sie in der *PLATISMATIA*-Species erst durch Extraktion angereichert werden.

Das gemeinsame Vorkommen von Physodsäure und 3-Hydroxyphysodsäure wurde auch bei anderen Flechtenarten beobachtet, so von T. Hirayama et al. ⁷⁴⁾ in *Hypogymnia enteromorpha* und von J. A. Elix ⁷⁵⁾ erst kürzlich in *Hypogymnia billardieri*.

4-O-Methylphysodsäure war bisher noch nicht bekannt.

4. Alektoronsäuregruppe

In Abb. 16 finden sich neben den Peaks der Physodsäuregruppe auch Signale, die nur durch die Anwesenheit von Alektoronsäure zu erklären sind.



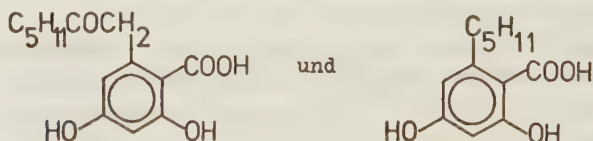
$R^1 = R^2 = H$:	Alektoronsäure	m/e 512
$R^1 = OH, R^2 = H$:	3-Hydroxyalektoronsäure	m/e 528
$R^1 = H, R^2 = OH$:	3'-Hydroxyalektoronsäure	m/e 528

Das Molekülion ist in dieser Verbindungsklasse nicht zu beobachten. Der Peak mit der höchsten Massenzahl liegt bei $M - H_2O$, gebildet durch Wasserabspaltung aus der ringtautomeren Form.

Ein schwaches Signal bei m/e 510 deutet auf eine Hydroxyalektoronsäure. Welches der beiden Isomeren vorliegt, kann massenspektrometrisch in einem so komplexen Gemisch nicht entschieden werden. Analog zu 3-Hydroxyphysodsäure ist die im Säureteil oxidierte Form wahrscheinlicher.

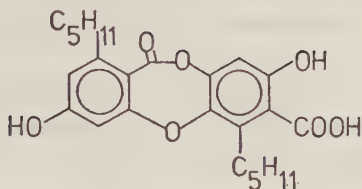
Beide Verbindungen sind bislang noch nicht bekannt gewesen.

Nachdem nun mit den Vorstufen



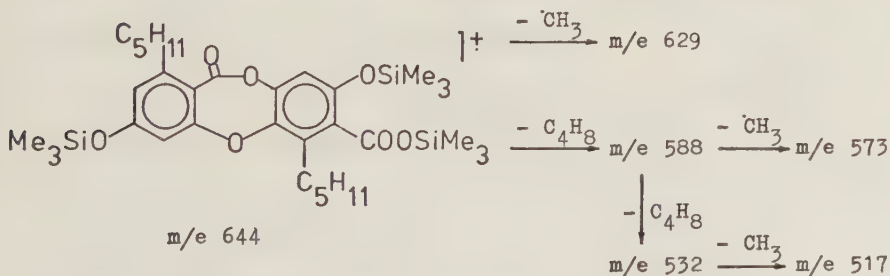
eine ganze Reihe von möglichen Kombinationen in PSEUDEVERNIA furfuracea aufgetaucht sind, bleibt nur noch die folgende

Verbindung übrig:



Ein Molekülion ist hier wiederum nicht zu erwarten, der höchste Peak dürfte $(M - CO_2)^+$ sein (m/e 384). Da in diesem Massenbereich jedoch schon Fragmente anderer Depsidone liegen, ist eine Entscheidung auf diesem Weg nicht möglich.

Die Silylierung macht zwar das Vorhandensein dieses bislang noch nicht bekannten Moleküls wahrscheinlich



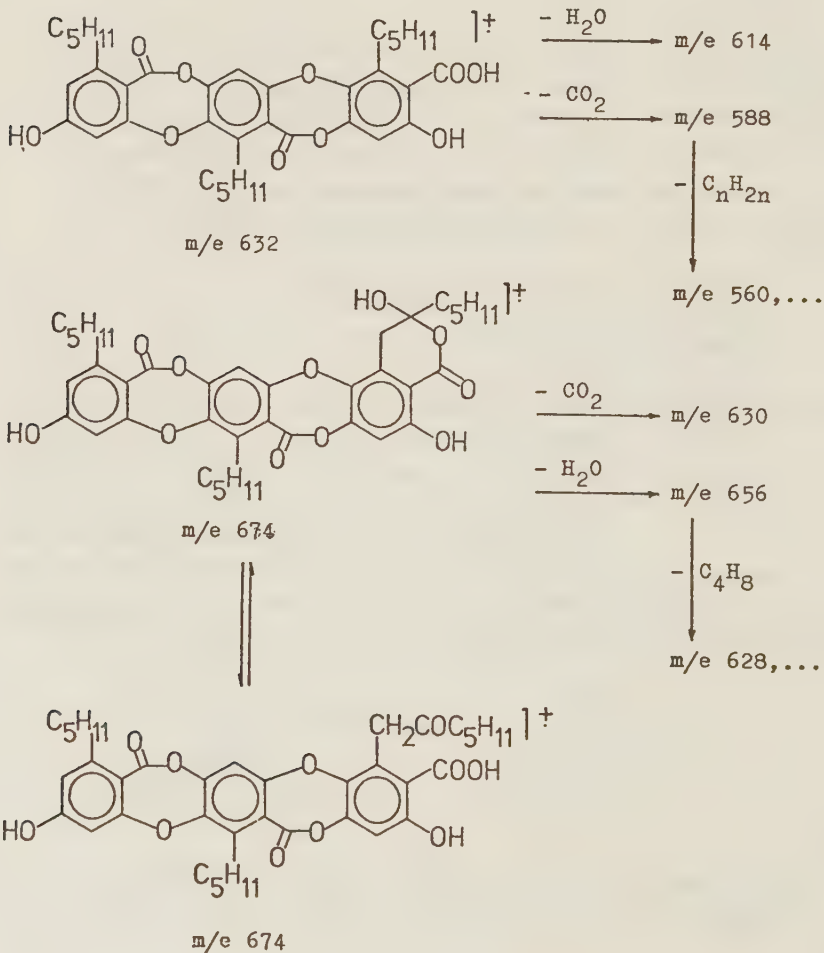
aber da es sich nur um sehr geringe Konzentrationen handeln kann, soll dieses Thema nicht weiter behandelt werden.

5. "Tridepsidone"

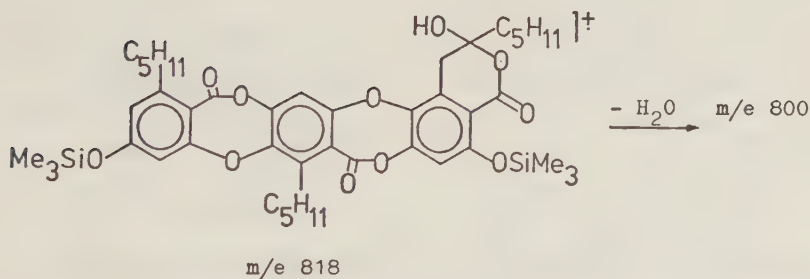
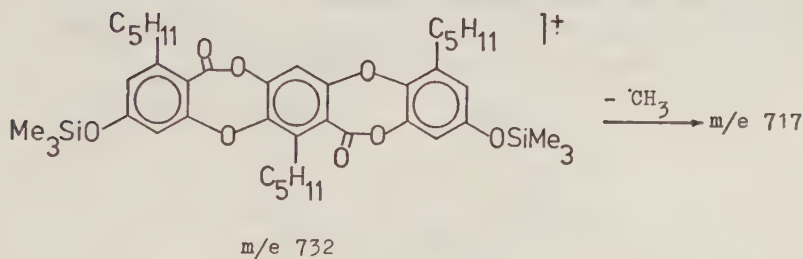
Zwei relative starke Peaks in Abb. 16 bei m/e 656 und 588 können nicht mit bis jetzt beschriebenen Depsidonen erklärt werden.

Abspaltungen von m/e 56 (C_4H_8) deuten auf Verbindungen, die mit den oben besprochenen verwandt sein müssen.

Als Möglichkeiten bleiben nur zwei Vertreter einer noch unbekannten Klasse:



Nach der Silylierung erhält man sehr schwache Signale für:



Die Existenz von Tridepsiden läßt das Vorkommen dieser "Tridepsidone" wahrscheinlich werden.

In PSEUDEVERNIA furfuracea wurden bisher Atranorin, Chloratranorin und Physodsäure gefunden.

W. Brieger ⁷⁶⁾, O. Hesse ⁷⁷⁾ und W. Thies ⁷⁸⁾ beschreiben noch die folgenden, bis jetzt allerdings nicht näher identifizierten Inhaltsstoffe:

Olivorsäure

Fureverninsäure

Apoolivorsäure

Furevernursäure

Furevernensäure

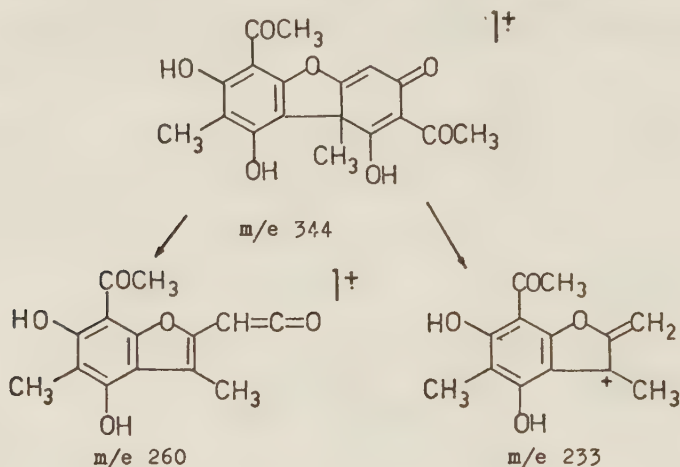
Furfuracinsäure

Daneben finden sich, auch in der neueren Literatur, weitere Berichte über unbekannte Metaboliten.

III. Usninsäure

Da Usninsäure schon früher ⁷⁹⁾ ausführlich behandelt wurde, soll sie hier nur kurz gestreift werden.

Usninsäure ist unverwechselbar zu erkennen an den Peaks m/e 344 (61% rel. Int.), 260 (60%) und 233 (100%).



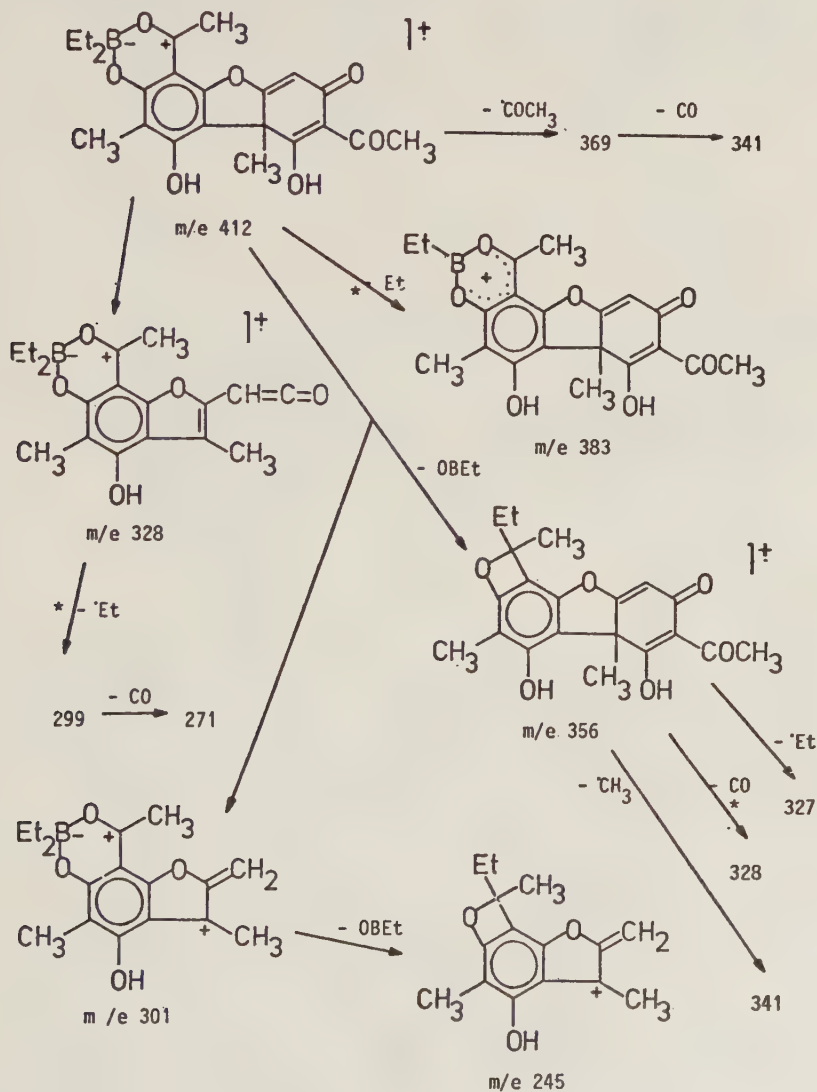
Sie tritt in den folgenden der untersuchten Flechten auf:

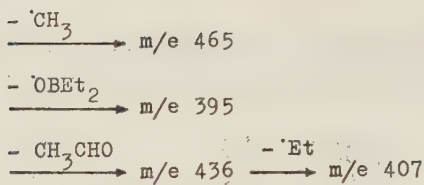
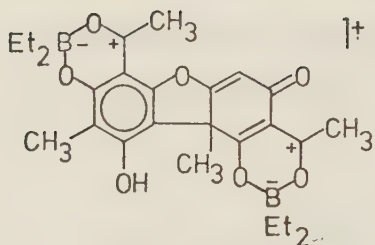
<i>Cladonia coniocraea</i> (Sp.)	<i>Parmelia taractica</i>
<i>Cladonia convoluta</i>	<i>Parmelia tiliacea</i> (Sp.)
<i>Cladonia deformis</i>	<i>Pseudevernia furfuracea</i> (Sp.)
<i>Cladonia impexa</i>	<i>Ramalina duriaeri</i>
<i>Cladonia mitis</i>	<i>Usnea chaetophora</i>
<i>Cladonia pyxidata</i> (wenig)	<i>Usnea</i>
<i>Cladonia tenuis</i>	<i>Peltigera horizontalis</i> (Sp.)
<i>Cladonia uncialis</i>	

Setzt man eine dieser Flechten mit Trifluoressigsäureanhydrid um, so wird die enthaltene Usninsäure an allen Hydroxylgruppen derivatisiert; nach der Silylierung hingegen findet man keine entsprechenden Peaks.

Bei der Reaktion mit Triäthylboran bilden sich folgende Ver-

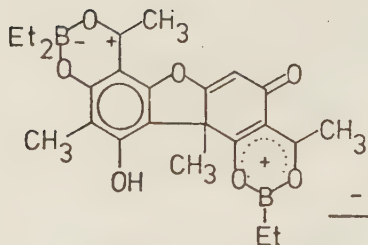
bindungen, deren Strukturen auf Grund ihrer charakteristischen Fragmentierung leicht zu erklären sind:





$m/e \ 480$

$- \text{Et}$



$m/e \ 451$

$- \text{OB}(\text{Et})_2$

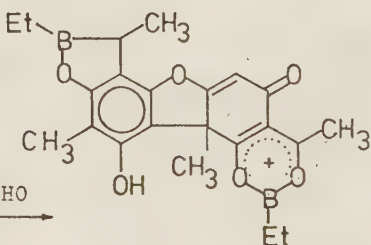
$- \text{CO}$

$m/e \ 395$

$m/e \ 423$

$- \text{CO}$

$m/e \ 395$



$m/e \ 407$

$- \text{CO}$

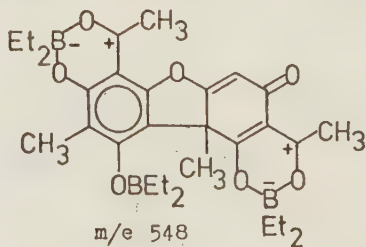
$m/e \ 379$

$- \text{OB}(\text{Et})_2$

$m/e \ 323$

Für den zweiten Bor-Heterocyclus gelten analoge Abbauege.

Auch die vollständig umgesetzte Verbindung



ist zu finden. Sie fragmentiert entsprechend.

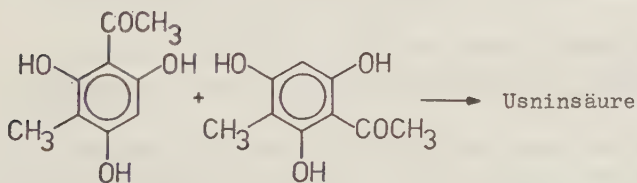
Zusammenfassend gilt:

- a) Die Derivatisierung mit BEt_3 erfolgt zuerst in der aromatischen Molekülhälfte unter Mitwirkung der Hydroxyl- und der Acetylgruppe. Anschließend reagieren die gleichen funktionellen Gruppen im anderen Molekülteil, und zum Schluß erst wird die einzelne OH-Funktion angegriffen.
- b) Mit 1 Boratom fragmentiert das Derivat noch nahezu genauso wie das Ausgangsprodukt. Ein starker Peak entsteht jedoch durch die Abspaltung eines Acetylrestes. Bei 2 oder 3 Boratomen wird zuerst in einem Heteroring eine Äthylgruppe abgetrennt, dann aus dem anderen Heteroring ein CH_3CHO -Molekül. Die Reihenfolge kann auch umgekehrt sein.
- c) Im Gemisch erscheinen die Derivate mit zunehmendem Derivatisierungsgrad bei jeweils tieferen Einlaßtemperaturen:

1 Boratom:	150°C
2 Boratome:	100°C
3 Boratome:	70°C

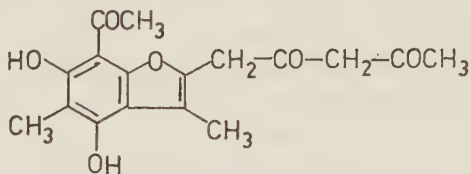
Die Übergänge verlaufen fließend.

Die Biosynthese der Usninsäure verläuft über die Kondensation von zwei Molekülen Methylphloracetophenon ⁸⁰⁾⁸¹⁾⁸²⁾.



Diese Verbindung konnte in keiner Flechte und in keinem der untersuchten Extrakte nachgewiesen werden.

Dagegen wurde, immer wenn Usninsäure vorhanden war, bei hohen Einlaßtemperaturen ein Peak bei m/e 318 gefunden, der schon in einer früheren Arbeit der Decarboxyusninsäure zugeschrieben worden war.



Weiterhin interessant ist das Auftreten "homologer" Peaks bei m/e 330 und 358. Verringert man nämlich die Elektronenenergie, so erscheinen diese Signale - ebenso wie das Molekölion der Usninsäure - mit relativ größerer Intensität, während die Peakhöhe der Bruchstücke stärker abnimmt. Weitergehende Untersuchungen über die Strukturen dieser "Methylusninsäure" und "Demethylusninsäure" wurden nicht durchgeführt.

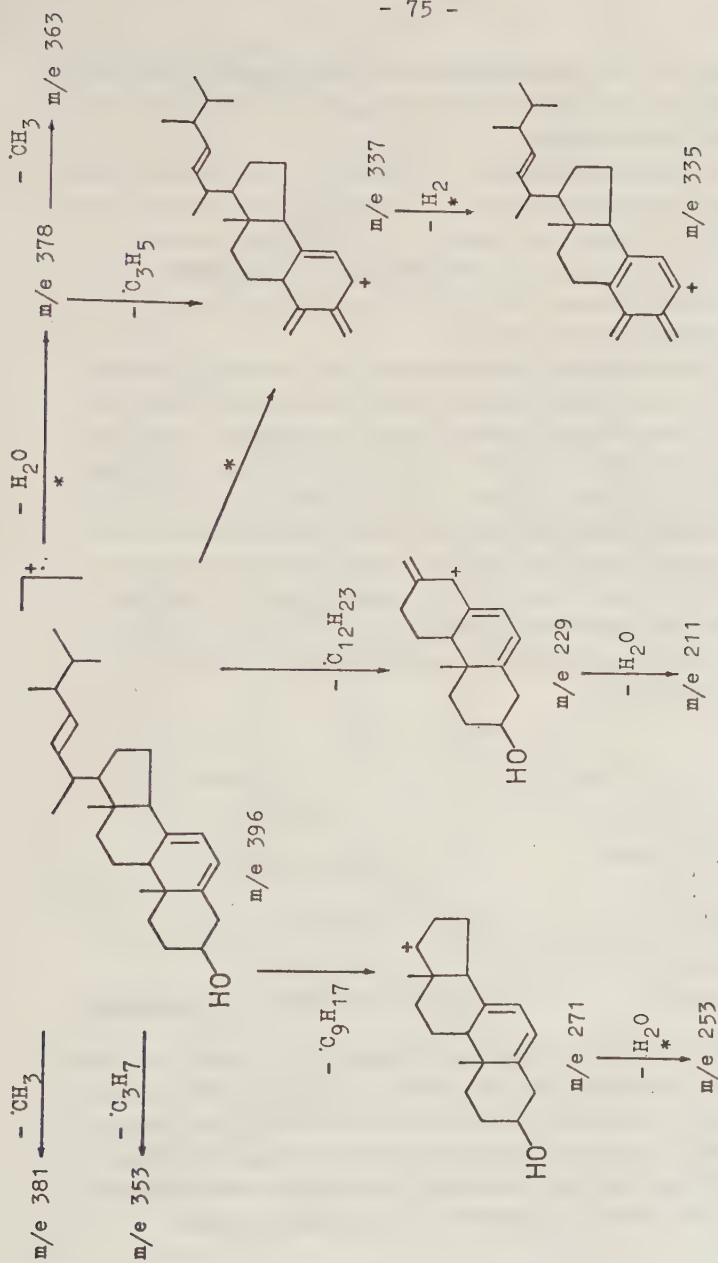
IV. Terpene, Sterine

Charakteristisch für alle untersuchten Flechtenarten war, daß C₂₈-Sterine als Gemisch aus mehr oder weniger hydrierten Formen vorliegen, bei denen jedoch Ergosterin immer überwiegt.

Der Bereich dieser Species reicht in einigen Fällen von m/e 392 (Tetra-Dehydroverbindung) bis m/e 400 (Tetrahydroform).

Die wichtigsten Peaks zur Identifizierung von Ergosterin sind das Molekölion bei m/e 396 sowie die Signale bei m/e 363 und 337 (vgl. Schema 10).

Da alle Fragmente mit intaktem Steroid-Ringgerüst dasselbe Muster von Hydrierung und Dehydrierung aufweisen - unab-

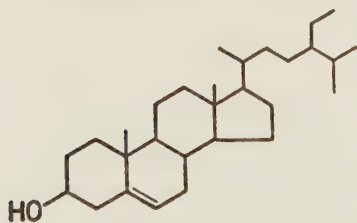


Schema 10: Ergosterin

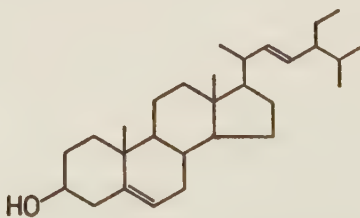
hängig davon, ob die Seitenkette schon abgespalten ist oder nicht -, muß der Ort dieser Veränderungen innerhalb des Ringsystems lokalisiert werden.

C₂₇-Sterine scheinen ebenfalls in Flechten vorzukommen, doch ist ihre Konzentration so gering, daß sie nur in wenigen Gesamtspektren zu beobachten sind, so in CLADONIA impexa, Cl. convoluta, Cl. digitata, Cl. furcata und Cl. deformis. Dort ist ein schwaches Signal bei m/e 386 zu finden, dem Molekulation von Cholesterin.

C₂₉-Sterine sind dagegen wiederum häufiger und mit größerer Konzentration vertreten. Auch hier gilt das Prinzip von Hydrierung und Dehydrierung, wobei die intensivsten Peaks bei m/e 414 (β-Sitosterin) und 412 (24-Äthylcholesta-5,22-dien-3β-ol) liegen. Da sich in einem so komplexen Gemisch allein aus dem Massenspektrum naturgemäß keine Strukturdaten mehr ableiten lassen, wurde für den Peak 412 angenommen, daß es sich um die oben bezeichnete Verbindung handelt - in Analogie zu den Arbeiten von S. Safe et al.⁸³⁾, der dieses Sterin aus Lobaria pulmonaria, L. scrobiculata und Usnea longissima isoliert.

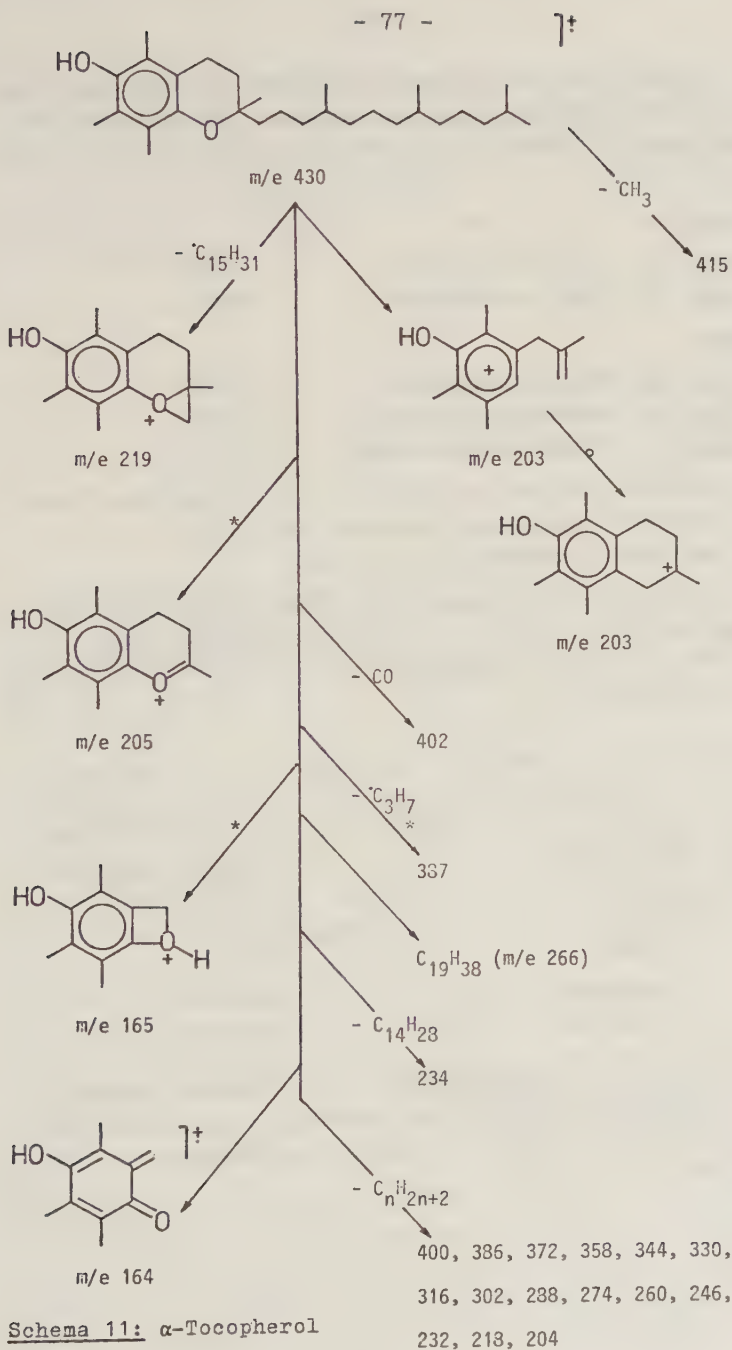


m/e 414
β-Sitosterin



m/e 412
24-Äthylcholesta-5,22-dien-3β-ol

α-Tocopherol (Fragmentierung siehe Schema 11) tritt in allen Flechten auf, wenn auch die gefundene Menge von Art zu Art stark schwanken kann. Da diese Verbindung wegen der phenolischen OH-Gruppe wesentlich saurer reagiert als die Sterole der Ergosterinreihe, kann sie von diesen sehr leicht mit alkalischen Extraktionsmittel abgetrennt werden.



Schema 11: α -Tocopherol

Zur Illustrierung der Mengenverhältnisse der Sterine in den verschiedenen Flechten und um zu zeigen, daß für isolierte Algen entsprechendes gilt, dienen die folgenden Teilspektren (m/e 350 - 450).

Flechten:

Abb. 17: CLADONIA pyxidata (145°C)

Abb. 18: USNEA chaetophora (140°C)

Algen:

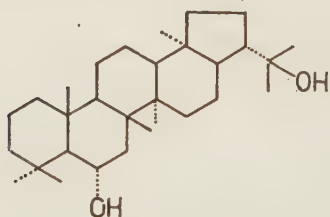
Abb. 19: TREBOUXIA-Species (155°C)

Abb. 20: CHLORELLA variegata (127°C)

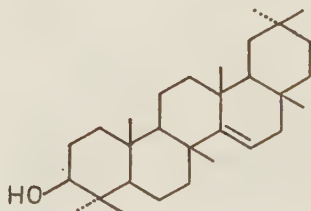
Abb. 21: CHLAMYDOMONAS eugamii (175°C)

Bei den Algen stellte sich heraus, daß eng verwandte Arten, z.B. CHLAMYDOMONAS eugamii und CHL. reinhardii auch sehr ähnliche Sterinzusammensetzung zeigen.

Als Vertreter aus der Terpenreihe findet man in Flechten Zeorin (m/e 444, 426, 411, 383, 207), Taraxerol (m/e 426, 411, 408, 393, 302), Taraxeron (m/e 424, 300) und Taraxeren (m/e 410, 286).



m/e 444
Zeorin

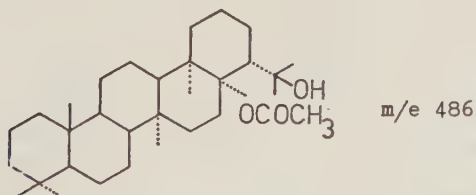


m/e 426
Taraxerol

Zeorin tritt in größeren Mengen auf in CLADONIA deformis und in PELTIGERA horizontalis, Taraxeron in kleinerem Umfang in CLADONIA deformis, PELTIGERA rufescens und SIPHULA ceratites.

Im Flechtenmassenspektrum von *PELTIGERA aphthosa* (Abb. 22) sind neben den Peaks von Peltigerin (siehe unter I.6.) Signale für Phlebsäure A und Phlebsäure B zu beobachten (Fragmentierung vgl. Schema 12 und 13).

Ob auch das von S. Shibata ⁸⁴⁾ gefundene Terpen 15 α -Acetoxy-22-hydroxyhopan



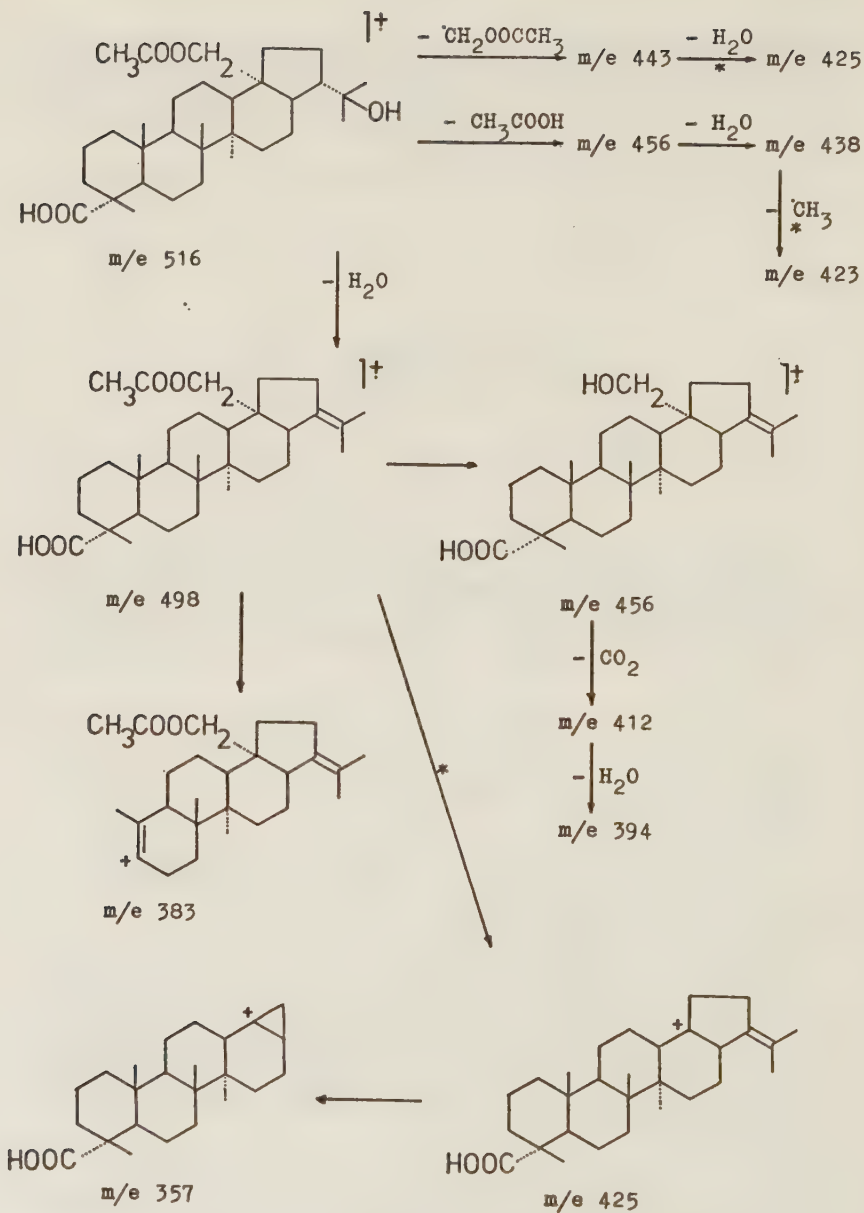
im Gesamtspektrum zu erkennen ist, soll hier wegen der starken Überlagerungen mit Phlebsäure A und B nicht mit letzter Sicherheit gesagt werden, wenn auch die Peaks bei m/e 408 ($M - H_2O - CH_3COOH$) und m/e 393 ($408 - CH_3$) starke Hinweise dafür liefern.

Das Spektrum eines nicht identifizierten Diterpens der Zusammensetzung $C_{20}H_{32}$ ist in Abb. 23 dargestellt, dem Flechtenmassenspektrum von *XANTHORIA aureola* bei einer Einlaßtemperatur von 20°C.

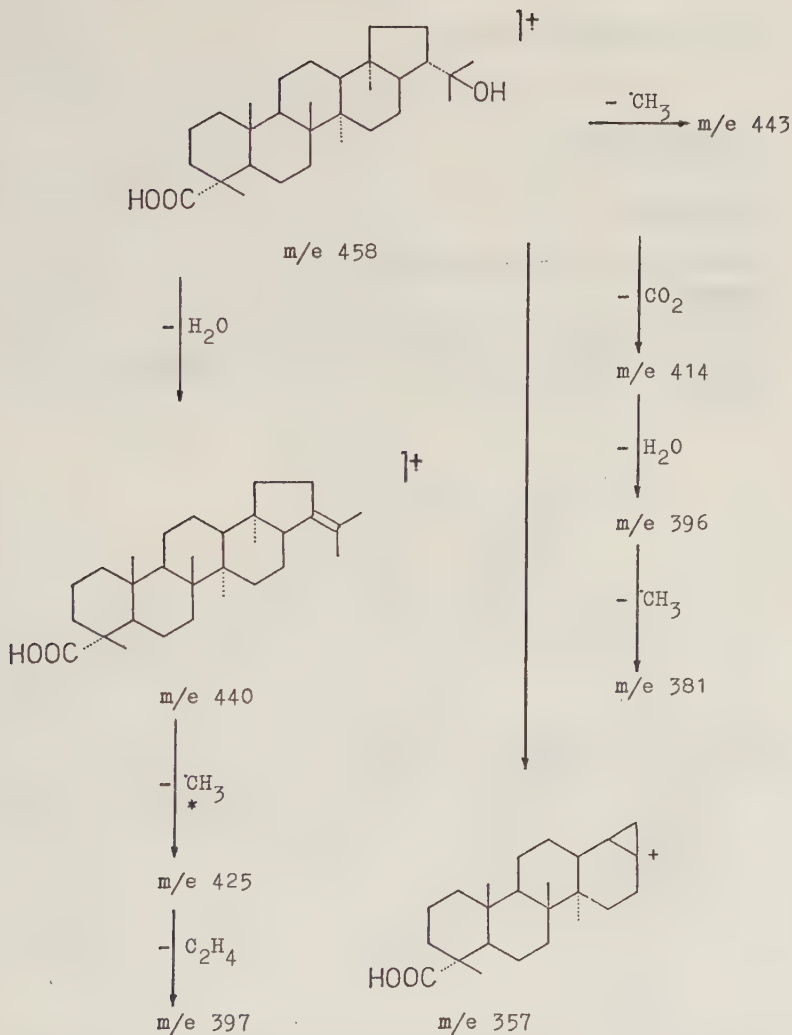
Verbindungen dieser Art wurden bisher in *Nephromaspecies* von O. Hesse ⁸⁵⁾, C. M. Wetmore ⁸⁶⁾ und W. Zopf ⁸⁷⁾ nachgewiesen und "Nephtrin" genannt.

Dasselbe Diterpen kann flechtenmassenspektrometrisch auch in *XANTHORIA parietina*, *USNEA hapalotera*, *USNEA chaetophora* und *PARMELIA tiliacea* erkannt werden. Da die Intensitäten aller entsprechenden Peaks in den fünf Spektren identisch sind, ist es sehr unwahrscheinlich, daß ein Gemisch mehrerer Isomerer vorliegt.

Chemotaxonomie über die Sterine der C_{27} -, C_{28} - und C_{29} -Reihe ist aus Gesamtflechtenspektren wegen der zu geringen Konzentrationen dieser Verbindungen nicht möglich; dagegen bieten sich die weniger häufig vorkommenden Triterpene wie Zeorin, Phlebsäure und Taraxerol oder auch das Diterpen



Schema 12: Phlebsäure A (oberer Massenbereich)



Schema 13: Phlebsäure B (oberer Massenbereich)

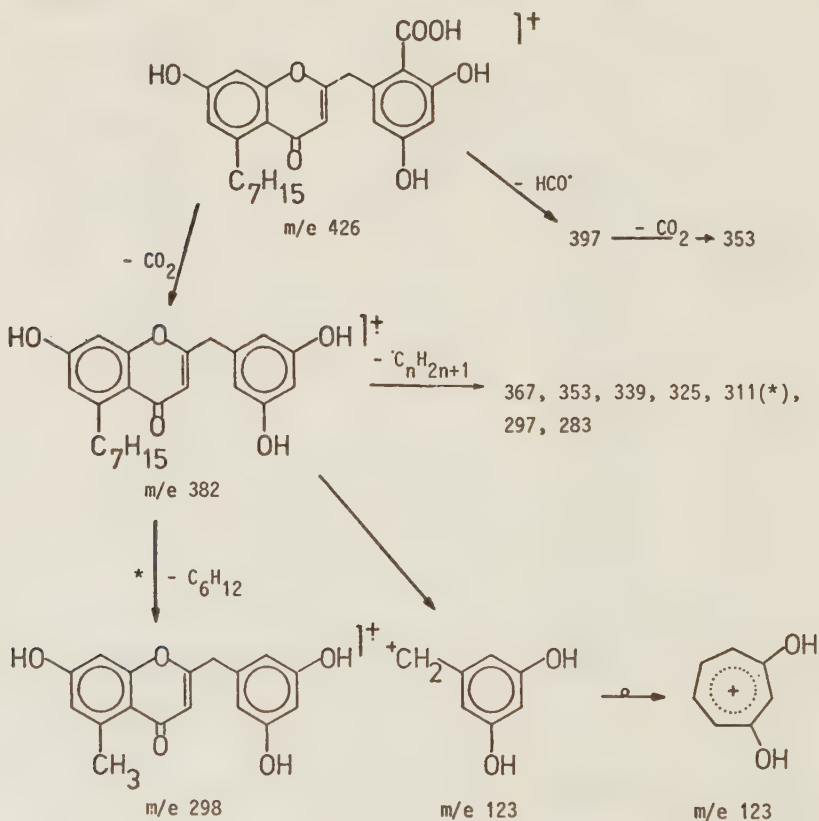
$C_{20}H_{32}$ für diese Zwecke an.

V. Verschiedenes

1. Siphulin

SIPHULA ceratites produziert als sekundären Metaboliten Siphulin.

Abb. 24 zeigt das Gesamtspektrum dieser Flechte bei $180^{\circ}C$ Einlaßtemperatur. Die Fragmentierung ist Schema 14 zu entnehmen:



Schema 14: Siphulin

2. Phosphat

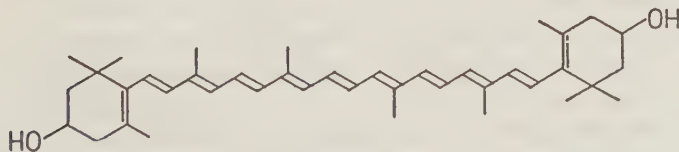
Phosphatreste, die biosynthetisch¹¹ in vielen Bereichen eingesetzt werden, sind ohne vorherige Derivatisierung nicht massenspektroskopierbar.

Setzt man dagegen die Gesamtpflanze - der Versuch wurde an Flechten und freien Algen durchgeführt - mit einem Silylierungsmittel um, so erhält man leicht flüchtiges Trimethylsilylphosphat, das im Spektrum gut an seinem charakteristischen Isotopenmuster und dem starken Massendefekt erkannt werden kann. Die wichtigsten Peaks sind das Molekülion (m/e 314) und das $(M - CH_3)^+$ -Signal (vgl. dazu Abb. 29). Derivatisiertes Pyrophosphat war nicht zu beobachten.

3. Carotine

Carotine können nicht aus direkten Flechtenmassenspektren bestimmt werden, da sie in zu geringen Mengen enthalten sind. Einfache Anreicherungsverfahren dagegen genügen oft schon, um meßbare Konzentrationen zu erreichen.

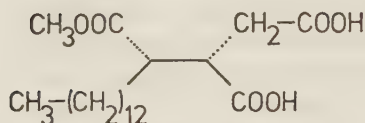
In Abb. 25 ist das Massenspektrum der 3. Petrolätherfraktion (siehe Tabelle 1) von *USNEA chaetophora* bei 200°C dargestellt, in dem Peaks bei m/e 568 (M^+), 550 ($M^+ - H_2O$), 476 ($M^+ - C_7H_8$), 458 ($M^+ - C_7H_8 - H_2O$) usw. auf ein Carotin der Bruttozusammensetzung $C_{40}H_{56}O_2$ hindeuten. Ein Vergleich der relativen Peakintensitäten mit mehreren Verbindungen aus der Sammlung von E. Stenhagen⁸⁸⁾ stimmt am besten mit Zeaxanthin überein.



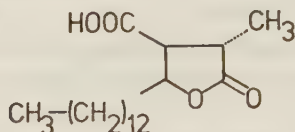
Zeaxanthin

VI. Fettsäuren

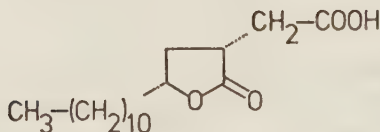
Untersuchungen über den Gehalt und die Art von Fettsäuren wurden bei Flechten in der Vergangenheit nur durchgeführt, wenn die Aussicht bestand, außergewöhnliche Species zu finden, z.B. Rangiformsäure⁸⁹⁾, Nephromopsinsäure⁹⁰⁾ oder Acaranosäure⁹¹⁾.



Rangiformsäure



Nephromopsinsäure



Acaranosäure

Geradkettige Carbonsäuren dagegen wurden nur in zwei Arbeiten - von H. Schlenk⁹²⁾ und von Y. Yamamoto⁹³⁾ - behandelt. Aber bereits diese wenigen Ergebnisse machen deutlich, daß es chemotaxonomische Beziehungen zwischen der Ausstattung mit Fettsäuren und der Stellung der Flechte und/oder ihrer Phyco- und Mycobionten geben muß. So stellte Yamamoto z.B. fest, daß Chlorococcales-Algen im Gegensatz zu Trebouxia keine Arachidonsäure enthalten.

Im Flechtenmassenspektrum können geradkettige Fettsäuren trotz ihrer relativ geringen Konzentration leicht erkannt werden, da sie schon bei niederen Einlaßtemperaturen (unter 100°C) erscheinen und das Molekülion den Basispeak liefert. In Abb. 26 ist das Spektrum von Stearinsäure dargestellt. Die Hauptfragmentierung verläuft unter Abspaltung von C_nH_{2n+1} -Radikalen zu Ionen der Masse $(87 + n \cdot 14)$, jeweils belegt durch metastabile Übergänge. Bei ungesättigten Fett-

säuren gewinnen naturgemäß solche Fragmente an Intensität, bei denen stabile Allylionen entstehen.

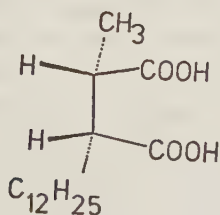
Abb. 27 zeigt das Flechtenmassenspektrum von DERMATOCARPON miniatum (Einlaßtemperatur 70 - 110°C).

Man erkennt folgende Fettsäuren (da die Lage der Doppelbindungen in einem Gemisch von Säuren nicht lokalisiert werden kann, sind die gebräuchlichsten Vertreter bzw. die schon in anderen Flechten gefundenen angegeben):

16:0	(m/e 256)	Palmitinsäure	(100)
18:3	(m/e 278)	Linolensäure	(15)
18:2	(m/e 280)	Linolsäure	(77)
18:1	(m/e 282)	Ölsäure	(16)
18:0	(m/e 284)	Stearinsäure	(14)
20:4	(m/e 304)	Arachidonsäure	(12)

Die prozentualen Mengenangaben (letzte Spalte) werden durch Vergleich der Peakhöhen erhalten und korrelieren daher nicht mit den absoluten Konzentrationen, da ungesättigte Verbindungen andere Molekülionenintensitäten als gesättigte Säuren zeigen.

Bei höheren Einlaßtemperaturen kann man die durch Metastabile belegten Übergänge $m/e\ 300 \rightarrow 282 \rightarrow 264$ beobachten. Ein Vergleich mit dem von J. P. Devlin⁹⁴⁾ veröffentlichten Spektrum von Roccellsäure ($M = 300$)



legt nahe, daß diese Fettsäure in der Flechte enthalten ist. Als Derivatisierungsverfahren kommen die Silylierung sowie

die Methylierung in Frage.

Um die Leistungsfähigkeit der Silylierung zu demonstrieren, sei auf Abb. 28 und 29 verwiesen, die Gesamtspektren der Alge *CHLAMYDOMONAS reinhardtii* vor und nach der Umsetzung mit BSTFA.

Im Spektrum der underivatisierten Alge findet man folgende Fettsäuren:

14:0	(m/e 228)	Myristinsäure	(3,9)
15:3	(m/e 236)	Pentadecatriensäure	(5,2)
15:0	(m/e 242)	Pentadecansäure	(2,4)
16:0	(m/e 256)	Palmitinsäure	(100)
17:0	(m/e 270)	Margarinsäure	(0,9)
18:4	(m/e 276)	Octadecatetraensäure	(0,9)
18:3	(m/e 278)	Linolensäure	(7,2)
18:2	(m/e 280)	Linolsäure	(2,4)
18:1	(m/e 282)	Ölsäure	(1,1)
18:0	(m/e 284)	Stearinsäure	(6,1)
19:1	(m/e 296)	Nonadecansäure	(0,7)
20:2	(m/e 308)	Eicosadiensäure	(0,5)

Die Fragmentierung silylierter Carbonsäuren entspricht insofern den freien Verbindungen, als auch hier eine Reihe $(M - C_nH_{2n+1})^+$ - jedoch mit stark verminderter Intensität - auftritt. Zusätzlich ist jedoch eine ungefähr gleich intensive Serie vorhanden, deren formale Zusammensetzung $(M - C_nH_{2n+1} + 2H)$ sein muß. Ihr Zustandekommen kann nicht erklärt werden. Basispeak ist jeweils das Ion $(M - CH_3)^+$. Das Molekülion erreicht ca. $1/3$ dieser Intensität.

Die Methylierung wurde beim Nachweis eingesetzt, daß die in *CLADONIA squamosa* zu beobachtende Folge von 14er-Differenzen von m/e 256 bis 508 auf freie Fettsäuren zurückzuführen ist, bei denen die ungeradzahligten Vertreter jeweils mit geringerer Intensität vorhanden sind als die geradzahligten. Nach der Methylierung tritt nämlich dieselbe alternierende Reihe auf, die größeren Peaks sind nun aber um 14 Masseneinheiten nach oben gerückt. Es kann sich also

bei den Ausgangsverbindungen nicht um Methylester von geradzahligten Säuren handeln.

Das Ion bei m/e 508 entspricht der 34:0-Verbindung.

Das Argument, daß diese Reihe durch die Molekülionen gesättigter Alkohole ($C_n H_{2n+1} OH$) hervorgerufen wird, kann durch die Tatsache entkräftigt werden, daß langkettige Hydroxy-Derivate keine Molekülionen zeigen.

Da bei den Flechten im allgemeinen die Konzentration der freien Fettsäuren relativ gering ist, empfiehlt es sich, wenn man weitergehende vergleichende Untersuchungen vornehmen will, durch Extraktion mit unpolaren Lösungsmitteln - hier genügen schon Mikroverfahren an wenigen Milligramm Flechte - Anreicherungen vorzunehmen und dann die Extrakte direkt zu vermessen.

Bei Algen scheint dies unnötig zu sein, da hier auch keine Überlagerungen mit Fragmenten aus anderen Substanzklassen zu befürchten sind. Algenspektren bestehen i.a. nur aus Fettsäuren, Sterinen und Terpenen, sowie aus Fetten.

In Tabelle 3 sind, um die taxonomische Bedeutung im Hinblick auf den Algenpartner zu zeigen, die Fettsäuren - aus Gesamtspektren erhalten - von vier Algenarten gegenübergestellt.

Chemotaxonomie von Algen mit Hilfe der Fettsäurezusammensetzung wurde schon von mehreren Autoren beschrieben.

R. W. Holton ⁹⁵⁾ stellte fest, daß bei blaugrünen Vertretern der Grad der Ungesättigtheit mit der Komplexität der Pflanze ansteigt, C. N. Kenyon ⁹⁶⁾ konnte bei 34 untersuchten blaugrünen, einzelligen Algen eine Verbindung zu anderen Charakteristika, wie etwa der Basenzusammensetzung der DNS, erkennen. Der Gehalt an den einzelnen Fettsäuren war unabhängig von den Kulturbedingungen. Schlenk und Gellermann ⁹⁷⁾ untersuchten die Säuren verschiedener Moose und konnten ähnliche Zusammenhänge feststellen.

Um auch ein Beispiel für eine ungewöhnliche Fettsäure anzuführen, sei auf Abb. 30 verwiesen, dem Flechtenmassen-

Tabelle 3: Intensitäten von Fettsäurepeaks (in %)

Fettsäure	CHLAMYDOM.	CHLAMYDOM.	NOSTOC	PROTOTHECA ⁺	
	reinhardii	eugamii	commune	portoric. v.	cif.
14:3 (222)	-	-	18,2	-	-
14:2 (224)	-	-	20,2	-	-
14:0 (228)	4	11	-	-	-
? (230)	-	-	17,9	-	-
15:3 (236)	5	13	11,5	-	-
15:1 (240)	-	-	100	-	-
15:0 (242)	2	-	-	-	15,2
16:1 (254)	-	-	17,9	-	-
16:0 (256)	100	100	17,3	100	100
18:4 (276)	1	-	-	-	-
18:3 (278)	7	40	-	-	5
18:2 (280)	2	7	-	21,8	48,7
18:1 (282)	1	-	-	6	14,6
18:0 (284)	6	6	8	9	16,3
19:1 (296)	0,7	-	-	-	-
20:5 (302)	-	-	6	-	-
20:3 (306)	-	-	8	-	-
20:2 (308)	0,5	7	-	-	-
20:0 (312)	-	-	-	-	26
22:0 (340)	-	-	-	-	30,9
24:0 (368)	-	-	-	-	29,2
26:0 (396)	-	-	-	-	?
27:0 (410)	-	-	-	-	11,4
28:0 (424)	-	-	-	-	17,5
29:0 (438)	-	-	-	-	3
30:0 (452)	-	-	-	-	2
31:0 (466)	-	-	-	-	0,8
32:0 (480)	-	-	-	-	1,6
33:0 (494)	-	-	-	-	1,6
34:0 (508)	-	-	-	-	Sp.
35:0 (522)	-	-	-	-	Sp.

+ 1. Spalte: 85°C, 2. Spalte: 157°C

Einlaßtemperatur der ersten 3 Algen: 150°C

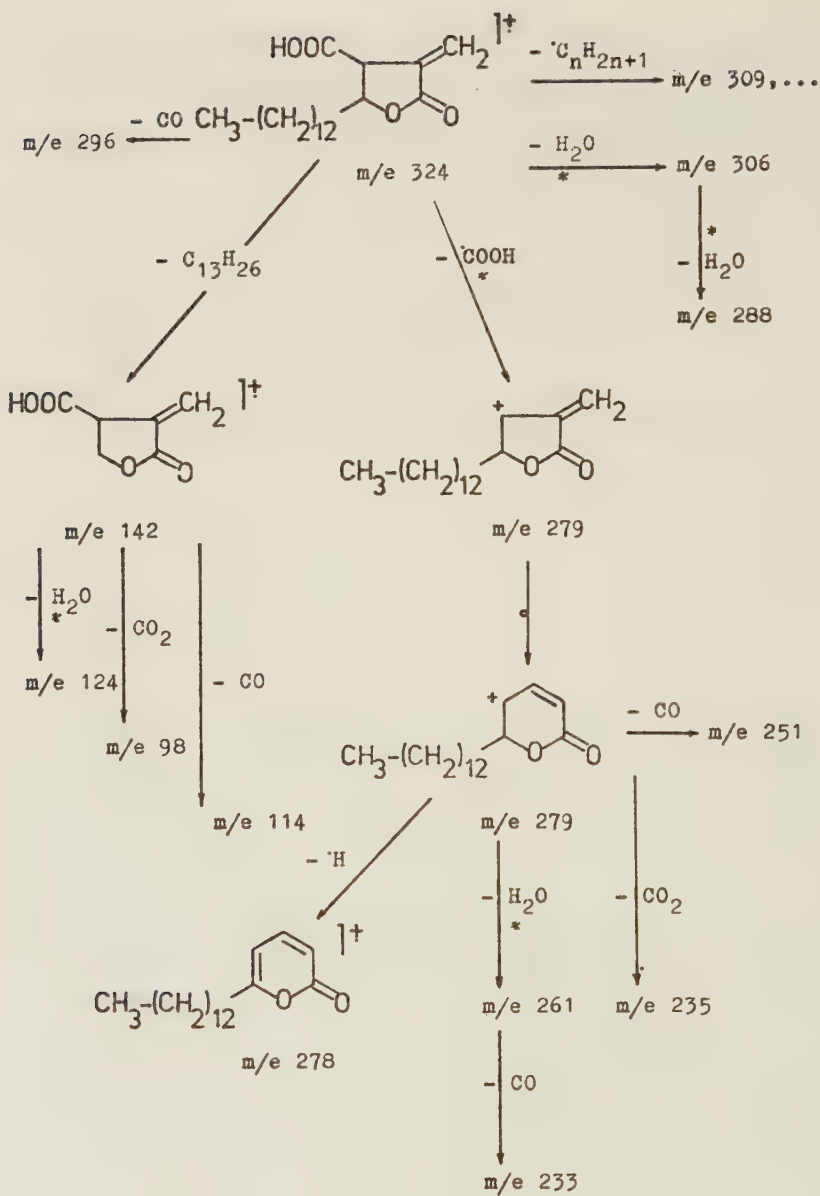
spektrum von CETRARIA islandica bei 135°C Einlaßtemperatur. Neben Protolichesterinsäure (m/e 324) erkennt man noch u.a. die 20:0-Säure (m/e 312), sowie Peaks bei m/e 338 (Methylester der Protolichesterinsäure ?) und m/e 350. Die Fragmentierung von m/e 324 ist in Schema 15 dargestellt.

Während man bei tiefen Einlaßtemperaturen ein Bild der freivorkommenden Fettsäuren erhält, zeigen die Spektren bei hohen Meßtemperaturen die gebundenen Säuren (Lipide, Wachse) an, die dann thermisch freigesetzt werden (vgl. die zweite Spalte von Prototheca portoricensis in Tabelle 3). Zum Vergleich seien die von H. Glasl ⁹⁸⁾ in Prot. port. gefundenen Fettsäuren angeführt (Gesamtanteil, relativer prozentualer Betrag):

12:0	0,5%	18:1	18,0%
14:0	0,6%	18:2	42,2%
16:0	24,2%	18:3	3,2%
16:1	0,9%	20:0	2,1%
16:2	0,2%	22:0	2,0%
18:0	2,1%	24:0	1,8%

An dieser Stelle sei nochmals betont, daß die in Tabelle 3 verwendeten Zahlenangaben keine Mengen darstellen sollen, sondern nur die relativen Intensitäten der Molekülonen. Umrechnungen in absolute Mengen sind nur über Gesamtionenstrommessungen nach vorheriger Eichung möglich.

Eine weitere Eigenschaft einiger Flechtenarten ist ihre Fähigkeit zur Bildung von Tetrahydroxyfettsäuren, die besonders von Y. Solberg ⁹⁹⁾¹⁰⁰⁾¹⁰¹⁾¹⁰²⁾ eingehend untersucht worden sind. Solberg folgert dabei aus spektralen Daten, u.a. auch durch massenspektrometrische Befunde, daß die Hydroxylgruppen immer in Stellung 9, 10, 12 und 13 stehen. Neben diesen freien Säuren wurden Ester mit langkettigen Alkoholen gefunden, deren C-Zahl jedoch nicht bestimmt werden konnte. Die Gesamtkettenlänge der Ester beträgt nach Solberg 32 bis 34.



Schema 15: Protolichesterinsäure

Da auch bei den hier untersuchten Flechten die von Solberg bereits beschriebenen Fragmente im Massenspektrum auftreten, soll etwas näher auf dieses Problem eingegangen werden.

Abb. 31 zeigt das Spektrum der 1. Ätherfraktion (vgl. Tabelle 1) von PSEUDEVERNIA furfuracea bei einer Einlaßtemperatur von 155°C.

Die Hauptfragmente der Tetrahydroxyfettsäuren sind in Schema 16 dargestellt (R = H), die der Ester in Schema 17, soweit sie sich von der ersten Gruppe unterscheiden.

Um die Werte für x und y zu klären, wurden statistische Betrachtungen der relativen Peakintensitäten durchgeführt.

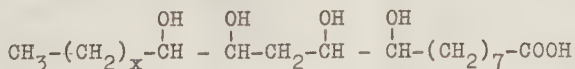
Dazu wurden die Signalthöhen der für silylierte Tetrahydroxyfettsäuren charakteristischen Fragmente jeweils auf das

Maximum einer x-Reihe bezogen. An Hand des Verlaufs der relativen Intensitäten eines bestimmten Fragments für variable x-Werte erkennt man dann bei den Säuren - vgl. Abb. 32 - zwei ausgeprägte Maxima bei x = 7 und x = 10. Das bedeutet, daß die zugehörigen Fettsäuren mit der größten Konzentration vertreten sind. Es folgen die Säuren mit x = 9, 8 und 6. Die Gesamt-C-Zahl beträgt demnach 20 bis 24.

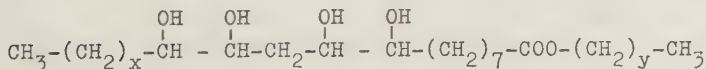
Ohne vorherige Silylierung lassen sich keine eindeutigen Ergebnisse erzielen, da zu große Überlagerungen verschiedenartiger Fragmente vorkommen.

Aus Abb. 33 für silylierte Tetrahydroxyester erhält man - weniger deutlich - y-Werte von 5, 7, 9, 10 und 12, d.h. es liegen Alkohole mit einer Kohlenstoffzahl von 6, 8, 10, 11 und 13 vor, mit dem Maximum beim Octylalkohol.

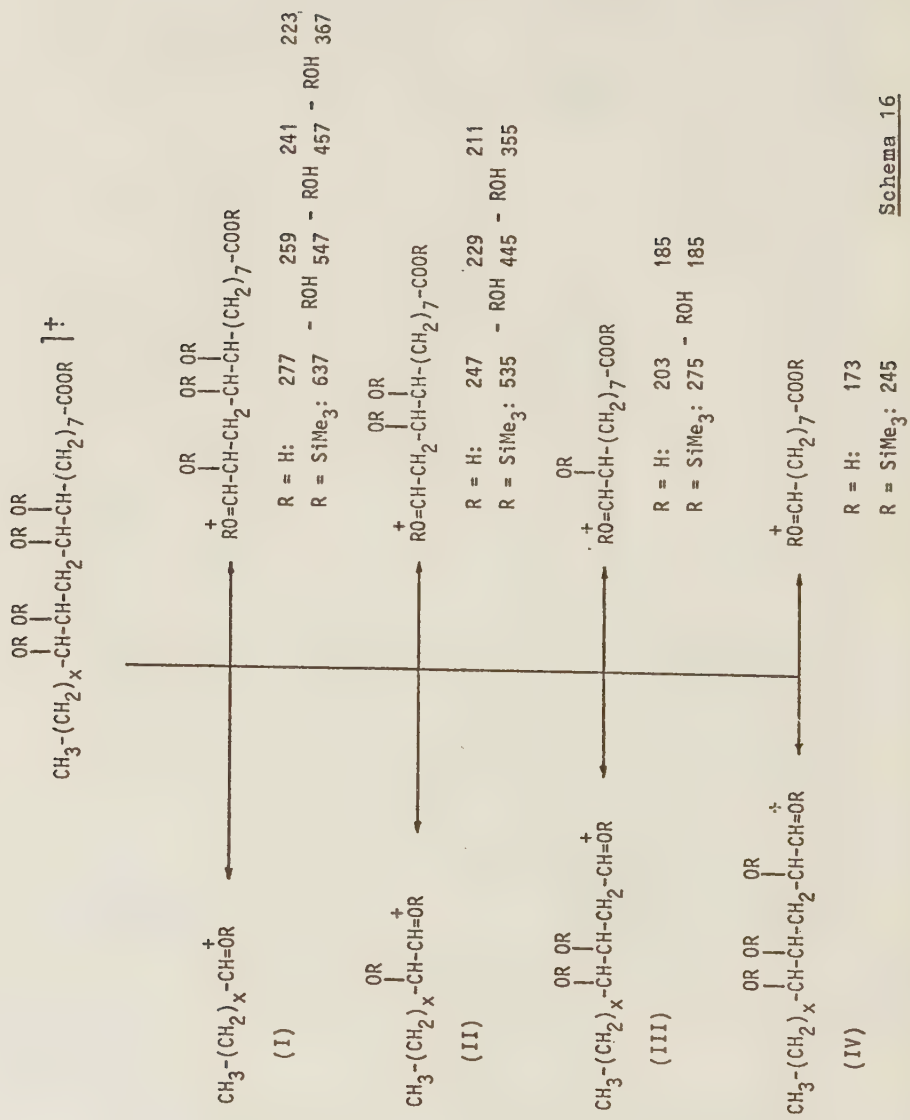
Zusammenfassend findet man also folgende Verbindungen in PSEUDEVERNIA furfuracea:

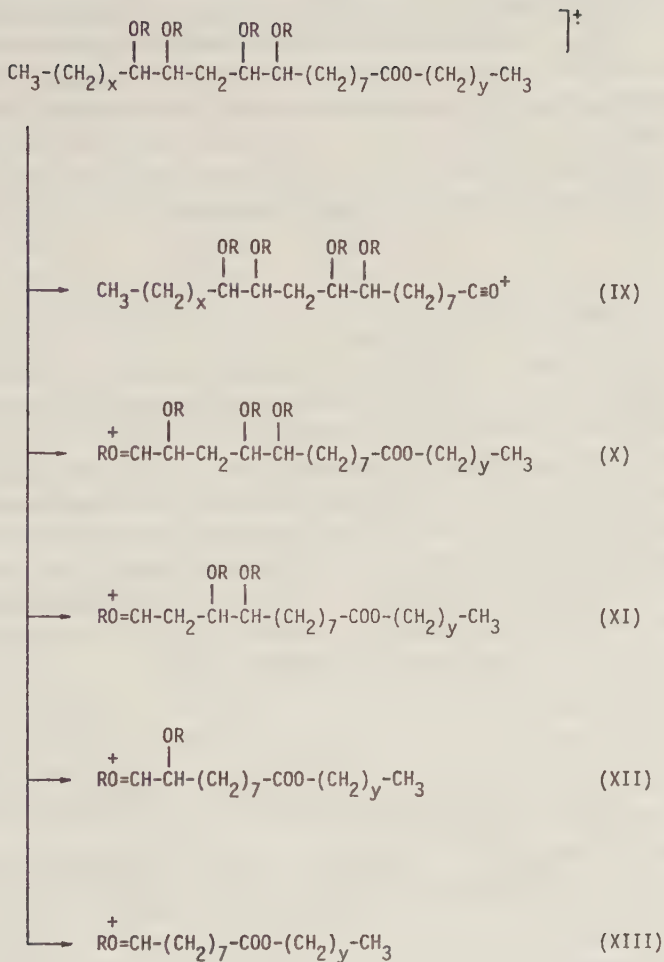


$$x = 6, 7, 8, 9, 10$$



$$y = 5, 7, 9, 10, 12$$





Schema 17: Tetrahydroxyfettsäure-Ester

Tetrahydroxyfettsäuren und ihre Ester mit langkettigen Alkoholen kommen auch in anderen, hier untersuchten Flechten vor. Da in diesen Fällen jedoch immer noch zusätzliche Verbindungen mit starken Peaks in den entsprechenden Extrakten auftauchten, wurden keine weiteren Untersuchungen durchgeführt.

Unbeantwortet bleibt daher die Frage nach der chemotaxonomischen Relevanz dieser Substanzklasse.

VII. Fette

Bei der Beschreibung von Glyceridmassenspektren soll die schon früher verwendete Bezeichnungsweise ¹⁰³⁾ für Di- und Triglyceride benützt werden.

Sie beruht auf der Bruttozusammensetzung von Fetten und läßt die Unterscheidung von Isomeren, die massenspektrometrisch nur bei isolierten Einzelverbindungen möglich ist, außer acht. Triglyceride werden danach als $T_x-\Delta^y$, Diglyceride als $D_x-\Delta^y$ bezeichnet, wobei x die Summe der C-Atome der Fettsäuren und y die Anzahl der Doppelbindungen (Summe aus den Δ der einzelnen Säuren) darstellt.

1. Triglyceride

Massenspektren von Triglyceriden wurden schon 1960 von R. Ryhage und E. Stenhagen ¹⁰⁴⁾ beschrieben.

Nach M. Barber ¹⁰⁵⁾ kann die Fragmentierung nach folgendem Schema verallgemeinert werden:

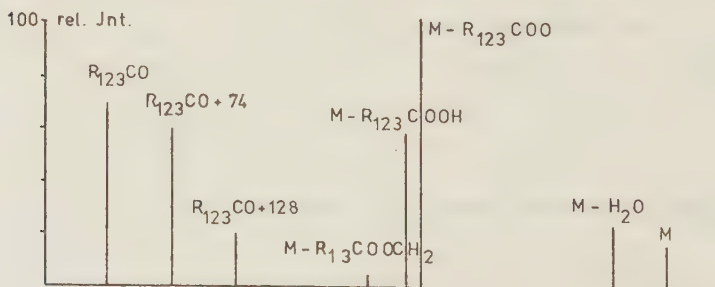


Abb. 34 zeigt das Spektrum von Tripalmitin ($T_{48}-\Delta^0$), dessen Fragmentierungsweg (Schema 18) nach den aus der Literatur nach Deuterierungsversuchen ¹⁰⁶⁾¹⁰⁷⁾ abgeleiteten Daten konstruiert wurde.

Geht man zu Triglyceriden über, die ungesättigte Fettsäuren enthalten, so ändern einige Peaks ihre relativen Intensitäten: $[M - RCOOH]$ wird umso stärker relativ zu $[M - RCOO]$, je größer der Grad der Ungesättigtheit ist (Tripalmitin: 50%, Triolein: 70%); umgekehrt ist es bei $[M - H_2O]$ und $[M]$ (Tripalmitin: 73%, Triolein: 29%). Bei gemischten Triglyceriden kann man dagegen keine allgemeine Regel angeben: bei Glycerin-1,3-distearat-2-oleat beträgt der $[M - H_2O]$ -Peak 194% im Vergleich zu $[M]$ und $[M - R_1COOH]$ 110% relativ zu $[M - R_1COO]$ sowie $[M - R_2COOH]$ 48% relativ zu $[M - R_2COO]$ (trotz des Isotopenanteils von $[M - R_1COO]$).

Lokalisierung von Doppelbindungen ist mit Einschränkungen möglich in allen Reihen, bei denen Ketten sukzessive fragmentieren. Sobald eine Doppelbindung erreicht ist, macht sich dies durch eine Vergrößerung der Peakanzahl innerhalb einer Gruppe bemerkbar.

Bei Fettgemischen ist dies naturgemäß nicht mehr so leicht festzustellen.

Sehr geeignet zur Identifizierung der in Triglyceriden enthaltenen Fettsäuren sind die Spektren negativer Ionen. Sie enthalten jeweils nur so viele Peaks, wie verschiedene Carbonsäuren vorhanden sind, hervorgerufen durch die Ionen $[RCOO]^-$.

Da jedoch die Intensität dieser Signale um den Faktor $5 \cdot 10^3$ geringer ist als die stärksten Peaks bei Elektronenstoßspektren, kann dieses Verfahren nicht auf die Untersuchung von Flechtenfetten angewandt werden. Dort ist die Konzentration der Lipide so gering, daß man keine Signale mehr findet.

2. Diglyceride

In Abb. 35 ist das Spektrum von Glycerin-1,2-dipalmitat dargestellt.

Da die Fragmentierung der von Triglyceriden weitgehend analog verläuft, soll sie hier nicht beschrieben werden (vgl. auch ¹⁰⁸). Wichtig ist nur das Verhältnis des Moleküliions zum Wasserabspaltungsprodukt: die Intensität von $[M]$ erreicht in diesem Fall nur 14% von $[M - H_2O]$.

Um Diglyceride von Triglyceriden mit gleichen Fettsäuren unterscheiden zu können, ist es nötig, eine der beiden Gruppen im Spektrum so zu verschieben, daß entsprechende Fragmente (v.a. $[M - H_2O]$ bei D und $[M - RCOOH]$ bei T) nicht mehr zusammenfallen. Hierfür geeignet sind die Silylierung und die Trifluoracetylierung, da bei diesen beiden Derivatisierungsverfahren die Moleküliionen der Diglyceride in den peakfreien Bereich des Triglyceridspektrums wandern (bei der Methylierung ist die Massendifferenz zu gering), und - bei quantitativer Reaktion - der Bereich zwischen m/e 550 und 650 nur noch von $[M - RCOO]$ bzw. $[M - RCOOH]$ von Triglyceriden ausgefüllt wird.

Bei der Umsetzung von Diglyceriden mit $(CF_3CO)_2O$ findet eine quantitative Derivatisierung statt. Das erhaltene Molekül (bei Dipalmitat ist $M = 664$) ist nun zu einem Triglycerid geworden mit entsprechender Fragmentierung. Die neuen Verbindungen sind farblose Flüssigkeiten, die durch Luftfeuchtigkeit schnell wieder in die Ausgangsprodukte gespalten werden. Das IR-Spektrum von Dipalmitat-TFA zeigt zwei CO-Banden bei 1795 und 1750 cm^{-1} .

Bei der Silylierung von Diglyceriden erhält man feuchtigkeitsempfindliche Silyläther, deren stärkster Peak im oberen Massenbereich durch $[M - CH_3]^+$ (bei Dipalmitat m/e 625) gebildet wird. Das Moleküliion erreicht ca. 5% der Intensität dieses Ions.

Die Fragmentierung derartiger Silylderivate ist kürzlich von T. Curstedt ¹⁰⁹) beschrieben worden, der allerdings keine Molekülpeaks findet.

Die Unterscheidung von Diglyceridphosphateestern und Diglyceriden ist massenspektrometrisch nicht möglich, da die Phosphatreste thermisch abgespalten werden, und man so bei beiden Substanzklassen gleiche Spektren erhält.

Hier hilft auch die Silylierung nicht weiter, da auch chemisch bereits eine Spaltung eintritt.

Da die massenspektrometrische Analyse von Fettgemischen bisher nur in einer Arbeit von R. A. Hites ¹¹⁰⁾ behandelt wurde - und hier beschränkt auf Triglyceride - und Untersuchungen über Flechtenlipide nicht vorliegen, ist es nötig, zunächst einmal Testgemische verschiedener Di- und Triglyceride herzustellen und ihre Reproduzierbarkeit im Massenspektrum zu untersuchen.

.Dazu wurden folgende Mischungen bereitet:

I: Tristearin:	1,820 mg = $2,045 \cdot 10^{-3}$ mMol
Triolein:	1,785 mg = $2,019 \cdot 10^{-3}$ mMol
II: Tripalmitin:	2,282 mg = $2,831 \cdot 10^{-3}$ mMol
Glycerin-1,2-di- palmitat:	2,626 mg = $4,628 \cdot 10^{-3}$ mMol
III: Triolein:	1,330 mg = $1,505 \cdot 10^{-3}$ mMol
Glycerin-1,3-di- stearat-2-oleat:	1,501 mg = $1,690 \cdot 10^{-3}$ mMol
Tristearin:	2,375 mg = $2,669 \cdot 10^{-3}$ mMol
IV: Tripalmitin:	4,321 mg = $5,631 \cdot 10^{-3}$ mMol
Tristearin:	3,039 mg = $3,414 \cdot 10^{-3}$ mMol
Triolein:	1,931 mg = $2,184 \cdot 10^{-3}$ mMol
Glycerin-1,2-di- palmitat:	1,953 mg = $3,438 \cdot 10^{-3}$ mMol
Glycerin-1,3-di- stearat-2-oleat	2,045 mg = $2,303 \cdot 10^{-3}$ mMol

Die Teilspektren in den Bereichen von [M], [M - H₂O], [M - RCOO], [M - RCOOH] für Triglyceride und [M], [M - H₂O] für Diglyceride sind in Abb. 36 dargestellt.

Mischung I bestätigt die zur Berechnung enthaltener Diglyceridanteile notwendige Annahme, daß das Intensitätsverhältnis von $[M]$ zu $[M - RCOO]$ und $[M - RCOOH]$ bei Triglyceriden immer konstant bleibt. In extenso bedeutet das z.B.: $I(884) : I(603) = 1 : 14$, sowohl für die Reinsubstanz als auch für die Mischung.

Findet man nun ein Spektrum vor, bei dem $I(M) : I(M - RCOO)$ und $I(M) : I(M - RCOOH)$ größer ist als bei der Ausgangssubstanz, so ist der überhöhte Anteil auf die Anwesenheit eines Diglycerids zurückzuführen.

Zur Erläuterung dient Mischung II:

Tripalmitin:	806 : 551 = 1 : 109
	806 : 550 = 1 : 55
Mischung II:	806 : 551 = 1 : 138
	806 : 550 = 1 : 79

Trägt man nun die für Tripalmitin berechneten Anteile an den Peaks m/e 551 und 550 ab (siehe Abb. 36), so muß die Differenz den Gehalt an Dipalmitat ergeben. Über Gesamtionenstromberechnungen ließe sich auf diese Weise die Menge an Di- und Triglycerid quantitativ bestimmen.

Entsprechend wurden für die Mischungen III und IV die relativen Konzentrationen gewonnen und in die Abbildungen eingezeichnet

Da jedoch keine Vergleichssubstanzen für Flechtenlipide vorhanden waren, wurde dieses Verfahren nicht weiter verfeinert, sondern nur qualitative Untersuchungen vorgenommen.

Abb. 37 zeigt das Flechtenmassenspektrum von *USNEA chaetophora* bei 200°C Einlaßtemperatur im Bereich von m/e 500 bis 1000.

Man erkennt folgende Triglyceride:

$$m/e \text{ 876 bis 886: } T_{54}-\Delta^7 \text{ bis } T_{54}-\Delta^2$$

Die Gruppe der $[M - H_2O]$ zeigt die oben erwähnte Umkehr der Intensitäten: je weniger Doppelbindungen, umso größere Peaks. Daher dient m/e 868 als Beweis für das tatsächliche Vorkommen von $T_{54}-\Delta^2$ (m/e 886).

$T_{54}-\Delta^6$ könnte z.B. Trilinolein sein.

m/e 850 bis 860: $T_{52}-\Delta^6$ bis $T_{52}-\Delta^1$

Auch hier müssen wieder die $[M - H_2O]$ -Peaks beachtet werden. $T_{52}-\Delta^4$ wäre ein Triglycerid aus zwei Linolsäuren und einer Palmitinsäure.

Die Fragmentierung dieser Lipide liefert die beiden Gruppen m/e 571 bis 579 sowie m/e 597 bis 605.

"Homologe" Reihen - um m/e 615, 631 und 645 - deuten entweder auf homologe Fettsäuren, wobei auch ungeradzahlige Vertreter dabei sein müßten, oder - was wahrscheinlicher ist - auf epoxidierte ("gealterte") Formen, zumal bei lange gelagerten Flechten praktisch nur noch solche Peaks auftreten.

Das eindeutige Herausragen von m/e 645 und 647 scheint allerdings definierte Verbindungen anzudeuten. Hierbei kann es sich nur um die $[M - RCOO]$ -Form von $T_{60}-\Delta^{12}$ und Δ^{13} handeln. $T_{60}-\Delta^{12}$ enthält drei Arachidonsäuremoleküle. Hinweise auf freie Arachidonsäure liefert der Petrolätherextrakt der Flechte, bei dem ein starker Peak bei m/e 304 auftritt, dessen Isotopenverteilung auf $C_{20}H_{32}O_2$ hindeutet. Die nötigen Fragmentpeaks (hauptsächlich Allylsplattung) sind ebenfalls zu finden.

Da im Bereich um m/e 600 ungeradzahlige Ionen dominieren, scheint es aussichtslos, das Auftreten von Diglyceriden auch nur qualitativ festzustellen. Die Trifluoracetylierung hilft hier auch nicht weiter, da das Verhältnis Triglyceride : Diglyceride zu einseitig bei ersteren liegt. Die Derivatisierung zeigt nur, daß m/e 616 und 618 einmal acetylierbar sind. Das bedeutet, daß es sich hierbei um Hydroxy- $[(D_{36}-\Delta^3) - H_2O]$ und Hydroxy- $[(D_{36}-\Delta^2) - H_2O]$ handeln muß. Die zugehörigen H_2O -Abspaltungen (m/e 616 $\rightarrow$ 598) sind durch metastabile Übergänge belegt.

Der einzige Ausweg zur Identifizierung von Diglyceriden scheint deshalb in diesem Fall darin zu bestehen, die unterschiedliche Flüchtigkeit der beiden Verbindungsklassen auszunützen: Diglyceride sind flüchtiger als Triglyceride.

Durch Mikrosublimation - wenige Milligramm Flechte genügen - bei 150°C/0,2 Torr konnten die Diglyceride quantitativ abgetrennt werden.

Man findet nachstehende Vertreter:

m/e 572 bis 576 (Hauptpeak 574):

$[(D_{34}-\Delta^3) - H_2O]$ bis $[(D_{34}-\Delta^1) - H_2O]$

m/e 598 bis 604 (Hauptpeaks 600 und 602):

$[(D_{36}-\Delta^4) - H_2O]$ bis $[(D_{36}-\Delta^1) - H_2O]$

m/e 616 bis 620 (Hauptpeak 616):

Hydroxy- $[(D_{36}-\Delta^2) - H_2O]$ bis Hydroxy- $[(D_{36}-\Delta^0) - H_2O]$

Die Triglyceride hingegen sublimieren erst bei 190°C/0,1 Torr und man erhält das aus der Gesamtflechte schon bekannte Peakmuster.

Eine analoge Trennung wurde bei CLADONIA squamosa durch Mikroextraktion erreicht: Mit n-Heptan werden die Triglyceride angereichert, während im Rückstand die Diglyceride übrig bleiben.

Weiterhin erkennt man im Gesamtspektrum von USNEA chaetophora eine homologe Reihe geradzahliger Peaks: m/e 648, 676, 704 und 732.

Eine erste Vermutung legt nahe, daß es sich um die Diglyceridionen $[(D_{40}-\Delta^8) - H_2O]$ bis $[(D_{46}-\Delta^8) - H_2O]$ handeln könnte. Dem widerspricht aber ein Hydrierungsversuch mit Raney-Nickel/ H_2 , bei dem alle ungesättigten Verbindungen quantitativ hydriert wurden, nur diese Serie unverändert bleibt. Auch freie gesättigte Fettsäuren können es nicht sein, da sie weder mit 5%iger NaOH-Lösung extrahierbar sind noch bei Silylierungsversuchen umgesetzt werden.

Also muß es sich um Ester gesättigter Fettsäuren handeln:



Um die Werte für n und m zu erhellen, muß man das Massenspektrum des Petrolätherextrakts bei niederen Einlaßtemperaturen betrachten.

Dort findet man eine Reihe von Peaks bei m/e 246, 260, 274,

288 und 302. Die beiden ersten Vertreter lassen sich jedoch nicht eindeutig dieser Serie zuordnen, da hier Überlagerungen mit anderen Verbindungsklassen vorkommen.

Bei m/e 288, das den größten Peak darstellt, muß es sich um $C_{24}H_{48}$ handeln, das durch Wasserabspaltung aus $C_{24}H_{49}OH$ entsteht. Dieses Molekül ist einmal silylierbar, die Fragmentationen von $C_{24}H_{49}OH$, die man im Spektrum findet, entsprechen den üblichen Fragmentierungsgängen.

Damit liegt der Wert für m fest: $m = 24$; n dagegen muß variabel sein, zumindest stärker variabel als m, da m/e 676, 704 und 732 annähernd gleiche Intensität aufweisen, auf der Alkoholseite jedoch m/e 288 eindeutig dominiert.

Also muß sein:

m/e 676: $C_{21}H_{43}-COO-C_{24}H_{49}$

m/e 704: $C_{23}H_{47}-COO-C_{24}H_{49}$

m/e 732: $C_{25}H_{51}-COO-C_{24}H_{49}$

Tatsächlich beobachtet man die zugrundeliegenden freien Fettsäuren auch im Gesamtspektrum der Flechte.

Bei Anreicherungsversuchen dieser Ester konnten auch die dazwischen liegenden ungeradzahligten Vertreter festgestellt werden.

Zu ähnlichen Ergebnissen kam vor kurzem Y. Solberg ¹¹³⁾ bei der Untersuchung von Extrakten aus *Peltigera canina* und *Omphalodiscus spodochrous*.

Vergleicht man die Fettmuster verschiedener Flechten im Massenbereich m/e 500 bis 750, so kann man drei grundlegende Typen unterscheiden.

Jedoch sind die Grenzen fließend, auch wenn anscheinend keine zwei Species ein völlig identisches Bild zeigen. Graduelle Unterschiede kommen immer vor, selbst bei zwei so eng verwandten Arten wie *XANTHORIA parietina* und *XANTHORIA aureola*.

Im folgenden sollen die drei Grundtypen beschrieben werden, sowie zwei Beispiele aus jeder Gruppe.

Typ A: Überwiegen der Triglyceridbruchstücke im Flechtenmassenspektrum (ungeradzahlige m/e-Werte)

A1: ausschließlich Triglyceridpeaks, v.a. m/e 577 und 603 durch $[T_{52}-\Delta^4]$ und $[T_{54}-\Delta^5]$
Ester: m/e 704 und 732

A2: starke Diglycerid-Anteile (m/e 574, 616, 658) neben dominierenden Triglyceriden (m/e 577, 603)

Abb. 37: USNEA chaetophora (A1)

Abb. 39: PSEUDOCYPHELLARIA aurata (A2)

Typ B: Überwiegen der Diglyceridpeaks

B1: v.a. $[D_{34}-\Delta^2]$ (m/e 574) und $[D_{36}-\Delta^2]$ (m/e 602)
Ester: m/e 676 und 704

B2: v.a. Hydroxy- $[D_{36}-\Delta^3]$ (m/e 616) und $[D_{34}-\Delta^2]$ (m/e 574), wenig $[D_{36}-\Delta^2]$ (m/e 602)

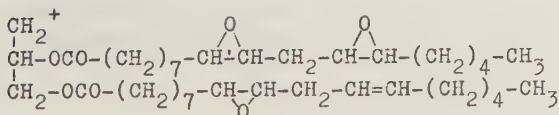
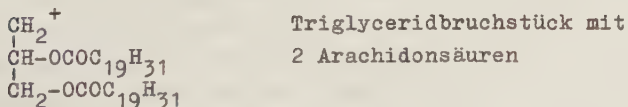
Abb. 40: CLADONIA deformis (B1)

Abb. 38: PARMELIA taractica (B1)

Abb. 42: XANTHORIA parietina (B2)

Abb. 43: PELTIGERA canina (B2)

Typ C: Diese Gruppe verdankt ihre Eigenständigkeit wahrscheinlich nur dem Alter der beteiligten Flechten, von denen alle mehr als 40 Jahre lagerten, bevor sie untersucht wurden. Daß in diesem Zeitraum Veränderungen (Epoxidierungen) an den ungesättigten Fettsäuren stattgefunden haben, ist anzunehmen. Für den Peak bei m/e 647 lassen sich prinzipiell zwei Strukturen angeben:



Angesichts des hohen Alters der Flechten (Lagerung an Luft) wird man sich für die zweite Möglichkeit (Triglyceridbruchstück mit 2 epoxidierten Linolsäuren) entscheiden. Zur Demonstration genügt Abb. 41.

Eine ähnliche Typifizierung ergibt sich für die Spektren von Algen.

Eine untersuchte TREBOUXIA-Species ließ sich zwanglos in Gruppe A einordnen. Der einzige Unterschied war das verstärkte Vorkommen von $[D_{32}-\Delta^0]$.

CHLORELLA variegata muß mit Einschränkungen Typ C zugerechnet werden.

NOSTOC commune verlangt die Bildung einer neuen Gruppe: Typ E (vgl. Abb. 44). Hier dominieren $[D_{31}-\Delta^0]$, $[D_{32}-\Delta^0]$, $[D_{34}-\Delta^2]$ und $[D_{35}-\Delta^1]$, also Diglyceride, die auch ungeradzahlige Fettsäuren enthalten müssen.

CHLAMYDOMONAS eugamii und CHL. reinhardii sind ähnlich, sollen aber dennoch in einen neuen Typ F eingereiht werden (Abb. 45). Hier sind $[D_{31}-\Delta^1]$, $[D_{32}-\Delta^0]$ und $[D_{34}-\Delta^1]$ stark vertreten.

Tabelle 4 gibt eine Zusammenstellung der untersuchten Flechten, ihre Typeneinteilung und - wenn möglich - ihren Phyco-bionten an. Weiterhin sind die zugehörigen Unterordnungen und Familien angeführt.

Problematisch bei dieser massenspektrometrischen Typifizierung sind jedoch folgende Punkte:

1. Probenentnahme: Um repräsentative Ergebnisse zu erhalten, müssen immer die gleichen Pflanzenteile verwendet werden, da sich z.B. zwischen Thallus und Fruchtkörper Unterschiede im Fettmuster zeigten. Für die vorliegenden Untersuchungen wurde daher eine möglichst gleichteilige Mischung der verschiedenen Pflanzenteile verwendet.

Tabelle 4: Fettmuster

<u>Flechte/Alge</u>	<u>Typ</u>	<u>Phycobiont</u>	<u>Familie</u>
<u>Lecanorineae:</u>			
USNEA chaetophora	A1		Parmeliac.
PSEUDEVERNIA furfuracea	A2 ?	Trebouxia	Parmeliac.
PLATISMATIA glauca	A1		Parmeliac.
CLADONIA rangiferina	B1	Trebouxia glom.	Cladoniac.
deformis	B1	Trebouxia glom.	Cladoniac.
gracilis	B1	Trebouxia glom.	Cladoniac.
convoluta	B1		Cladoniac.
tenuis	B1		
CETRARIA islandica	B1	Aspicilia	Parmeliac.
PARMELIA taractica	B1		Parmeliac.
tiliacea	B2		Parmeliac.
UMBILICARIA pustulata	C	Trebouxia	Umbilicar.
<u>Peltigerineae:</u>			
PSEUDOCYPHELLARIA aurata	A2		Stictac.
STEREOCAULON vesuvianum	B1		Stictac.
PELTIGERA apthosa	C	Nostoc punctif.	Peltiger.
canina	B2	Nostoc punctif.	Peltiger.
horizontalis	C	Nostoc punctif.	Peltiger.
rufescens	B2 ?	Nostoc punctif.	Peltiger.
<u>Teloschistineae:</u>			
XANTHORIA aureola	B2	Trebouxia decol.	Telosch.
parietina	B2	Trebouxia decol.	Telosch.
<u>Verrucariaceae:</u>			
DERMATOCARPON miniatum	C	Hyalococcus	Verrucar.
<u>Imperfekte Ascomyceten-Fl.</u>			
SIPHULA ceratites	A1		
TREBOUXIA	A		
CHLORELLA variegata	C		
NOSTOC commune	D		
CHLAMYDOMONAS eugamii	E		
reinhardtii	E		

2. Flüchtigkeit: Da Diglyceride flüchtiger sind als Triglyceride, sollte immer dieselbe Aufheizrate und Meßtemperatur beibehalten werden. Betrachtet man nämlich den zeitlichen Verlauf der Peakintensitäten, so nimmt die Signalhöhe von Diglyceridfragmenten schneller ab als die von Triglyceridbruchstücken (*CETRARIA islandica*, ursprünglich Typ B1, wird zu A2 und schließlich A1; vgl. Abb. 46 und 47).

Zur Aufnahme der Spektren wurde mit dem verfügbaren Heizgerät möglichst rasch auf eine Temperatur von 195 - 205°C aufgeheizt und danach bei konstanter Einlaßtemperatur gemessen.

VIII. Kohlenhydrate

Charakteristisch für Flechten ist der hohe Anteil an niedermolekularen Kohlenhydraten, der mit ca. 6% am Trockengewicht der Gesamtflechte die Größenordnung der sekundären Stoffwechselprodukte erreicht ¹¹⁴⁾.

Von der relativen Konzentration dieser Verbindungen her gesehen würde sich daher die Massenspektrometrie als analytisches Verfahren anbieten. Da jedoch bei Kohlenhydraten im allgemeinen die Zersetzungstemperatur niedriger ist als die Verdampfungstemperatur, muß der massenspektrometrischen Untersuchung erst eine Derivatisierung - verbunden mit einer Vergrößerung der Flüchtigkeit - vorausgehen.

Alle in der Gaschromatographie üblichen Derivatisierungsmethoden mit "einzähnigen" Reagentien wurden auf ihre Verwendbarkeit in der erweiterten Flechtenmassenspektrometrie hin untersucht - also Methylierung, Silylierung, Acetylierung und die selten angewandte Trifluoracetylierung.

Die größte Flüchtigkeit zeigte sich bei silylierten und tri-

fluoracetylierten Kohlenhydraten, die Deutung der Massenspektren war am einfachsten bei Trifluoracetaten.

Ein weiterer Vorteil der Trifluoracetylierung liegt darin, daß das verwendete $(\text{CF}_3\text{CO})_2\text{O}$ einen Großteil der eventuell vorhandenen Depside oder Depsidone polykondensiert, so daß die Spektren nur noch aus derivatisierten Kohlenhydraten bestehen und leicht interpretiert werden können.

Vergleicht man die Massenspektren acetylierter und trifluoracetylierter Zucker, so stellt man bei letzteren einen wesentlich einfacheren Fragmentierungsgang fest - nur Abspaltung von $\text{CF}_3\text{COO}^\cdot$, CF_3COOH und $(\text{CF}_3\text{CO})_2\text{O}$ -, während bei Acetaten zusätzlich die Acetylgruppe selbst auch noch fragmentieren kann (Ketenspaltung). Aber auch die größere Dehnung der TFA-Spektren macht eine leichtere Übersicht möglich.

In den folgenden Abschnitten sollen die in den Flechten gefundenen Klassen von Kohlenhydraten genauer untersucht werden.

1. Trifluoracetylierung

Bevor mit der Besprechung einzelner Verbindungsklassen begonnen wird, sollen einige allgemeingültige Regeln für die Fragmentierung trifluoracetylierter Kohlenhydrate vorangestellt werden.

1. Der Peak mit der größten Massenzahl ist bei acyclischen Zuckern (auch cyclischen Glycosiden) immer das $[\text{M} - \text{F}]^+$ -Ion, das mit unterschiedlicher Intensität auftreten kann.
2. Intensive Fragmentionen entstehen immer dann, wenn Stabilisierung der Ladung durch Oxoniumionenbildung möglich ist (β -Spaltung).
3. Weiterfragmentierung erfolgt durch Eliminierung von CF_3COOH und $(\text{CF}_3\text{CO})_2\text{O}$, oft von einem metastabilen Peak begleitet.

4. Das in Analogie zur Fragmentierung von Acetaten denkbare Bruchstück CF_2CO (Difluorketen) wird nicht eliminiert.
5. In den abgebildeten Fragmentierungsschemata sind i.a. nur die Primärbruchstücke angegeben. Die sich anschließende Abspaltung von CF_3COOH und $(\text{CF}_3\text{CO})_2\text{O}$ wurde nicht mehr aufgeführt, obwohl am Ende jeder derartigen Kaskade sehr stabile Ionen entstehen.

a) Zuckeralkohole

Die Massenspektren trifluoracetylierter Zuckeralkohole wurden von O. S. Chizhov ¹¹⁵⁾ beschrieben.

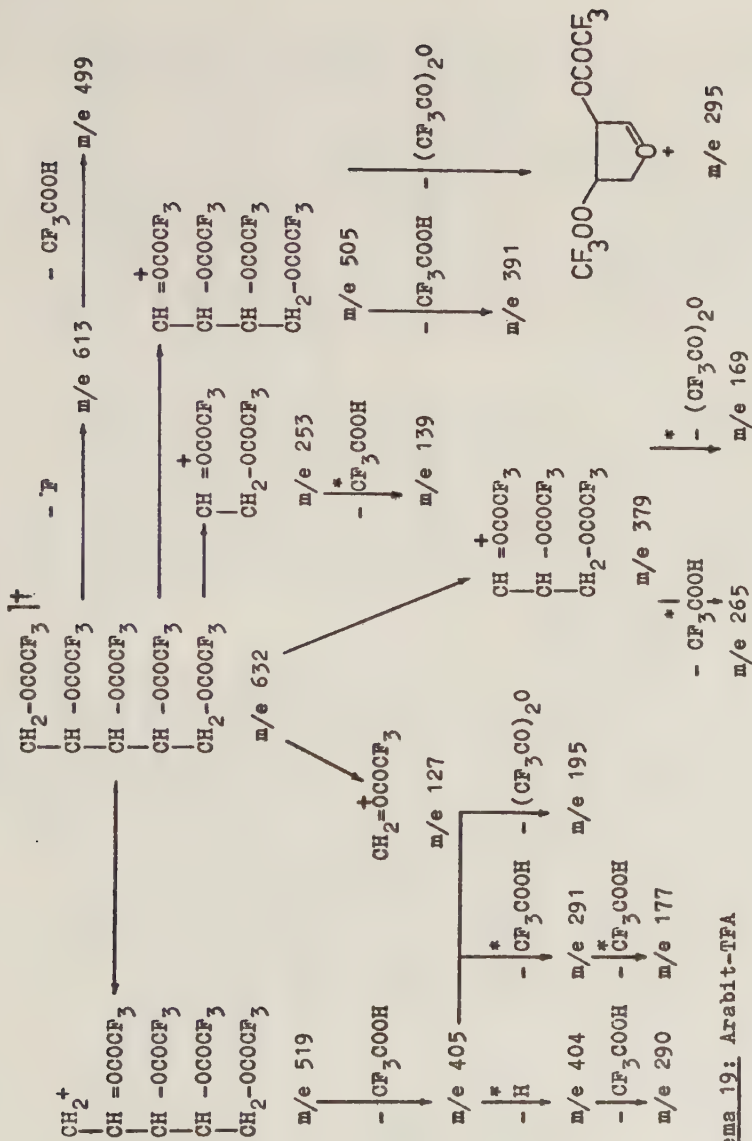
Nach Chizhov zeigen alle Polyole außer Glycerin und Desoxyhexit ein Molekülion. Dies konnte nicht bestätigt werden; vielmehr handelt es sich bei den "Molekülionen" Chizhows in Wirklichkeit um die $[\text{M} - \text{F}]^+$ -Ionen, die jeweils die Fragmente mit der höchsten Massenzahl darstellten.

Dagegen waren bei cyclischen Polyolen, wie etwa Inosit-TFA, die von Chizhov nicht untersucht wurden, Molekülionen mit geringer Intensität festzustellen.

Abb. 48 zeigt das Massenspektrum trifluoracetylierten Arabits, die Fragmentierung ist in Schema 19 dargestellt. Die Spektren und Zerfallswege höherer und niederer Zuckeralkohole sind analog, isomere Verbindungen können nicht unterschieden werden.

Für Polyole charakteristische Peaks treten auf bei m/e 127, 253, 379, 505, 631 usw.; sie entsprechen Kettenbruchstücken. Für individuelle Vertreter charakteristisch sind die $[\text{M} - \text{CF}_3\text{COO}]^+$ -Ionen, also die Reihe m/e 141, 257, 393, 519, 645 usw. sowie die Serie m/e 235, 361, 487, 613, 739 et cetera, d.h. die $[\text{M} - \text{F}]^+$ -Ionen.

In Abb. 49 ist das Flechtenmassenspektrum von PSEUDOCYPHELLARIA aurata bei 20°C Einlaßtemperatur nach der Umsetzung der Gesamtflechte mit Trifluoressigsäureanhydrid dargestellt.



Schema 19: Arabit-TFA

Man kann Triole, Pentite sowie Hexite an den Peaks m/e 519 und 645 ($[M - CF_3COO]^+$) - m/e 267 ist zu schwach neben 265 - sowie an m/e. 235, 613 und 739 ($[M - F]^+$) erkennen.

Bei dem Triol handelt es sich um Glycerin, der Pentit wurde durch Extraktion isoliert und erwies sich nach Schmelzpunkt ($103^\circ C$) und Infrarotspektrum als Arabit, der Hexit dürfte Mannit sein, da nach E. A. Drew ¹¹⁶⁾ und D. H. S. Richardson ¹¹⁷⁾ dieser Zuckeralkohol als allgemeiner Reservestoff dient, und auch bei allen hier untersuchten Flechten ein Hexit nachgewiesen wurde.

Abb. 50 zeigt das TFA-Derivatspektrum von DERMATOCARPON miniatum bei $107^\circ C$ Einlaßtemperatur.

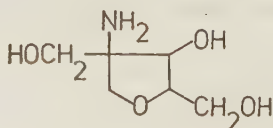
Zu beobachten sind ein Triol (Glycerin, das von nun an nicht mehr speziell erwähnt werden soll, da es auch als Fettbaustein naturgemäß in jeder Flechte vorkommen muß) sowie Hexite und Heptite, letztere erkenntlich am $[M - F]^+$ -Ion m/e 865 und an m/e 771 ($[M - CF_3COO]^+$) sowie an m/e 757 ($[M - CH_2OCOCF_3]^+$).

Ein Pentit kommt in dieser Flechte nicht vor.

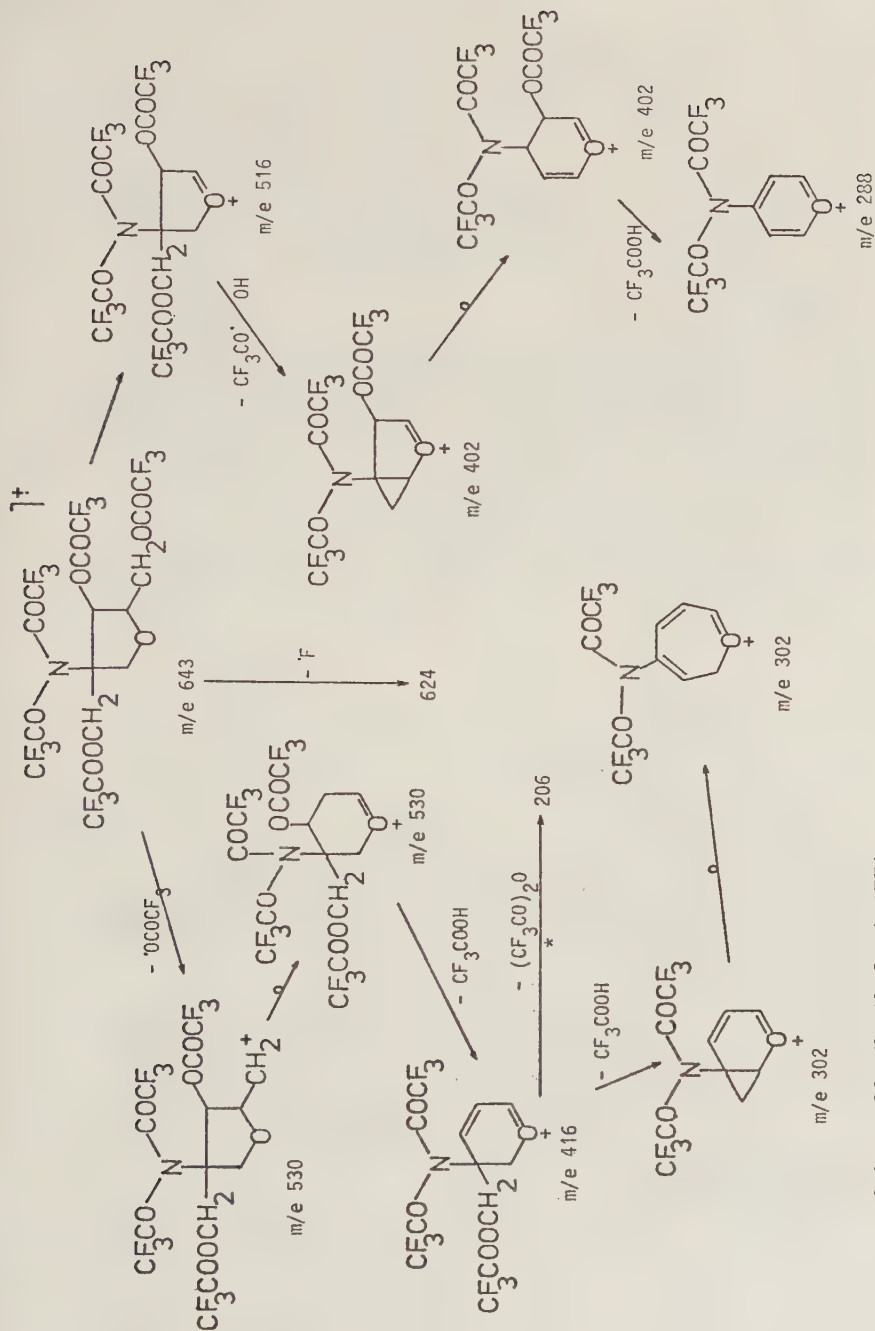
Ein ungewöhnliches Aminopolyol, dessen Struktur erst kürzlich von Y. J. Solberg ¹¹⁸⁾ aufgeklärt werden konnte, findet man in XANTHORIA parietina (Abb. 51). Die Fragmentierung dieser - Xantholamin genannten - Verbindung ist für das TFA-Derivat in Schema 20 dargestellt.

Xantholamin, das von Solberg aus Xanthoria parietina isoliert wurde, kann mit Hilfe der Derivatspektroskopie auch in XANTHORIA aureola nachgewiesen werden. Daneben treten in diesen Flechten noch Pentite und Hexite auf.

Spuren von Xantholamin finden sich auch in UMBILICARIA pustulata.



Xantholamin



Schema 20: Xantholamin-TFA

b) Mono- und Disaccharide

Das Massenspektrum trifluoracetylierter Glucose ist in Abb. 52 dargestellt.

Isomere Monosaccharide können nur unterschieden werden, wenn ihr Aufbau Anlaß zu unterschiedlichen Fragmentierungswegen gibt. So können Aldohexosen von Ketohexosen, Pyranoseformen von Furanoseformen, aber nicht α - von β -Isomeren differenziert werden.

Das Fragmentierungsverhalten von Hexopyranosen zeigt Schema 21, die Furanoseform ist in Schema 22 aufgeführt. Wie man den Schemata entnehmen kann, ist für die Furanose diagnostisch wichtig der Peak m/e 407 nach Abspaltung der Seitenkette, sowie alle Folgepeaks und für die Pyranose der Peak m/e 533 und die sich anschließende Serie.

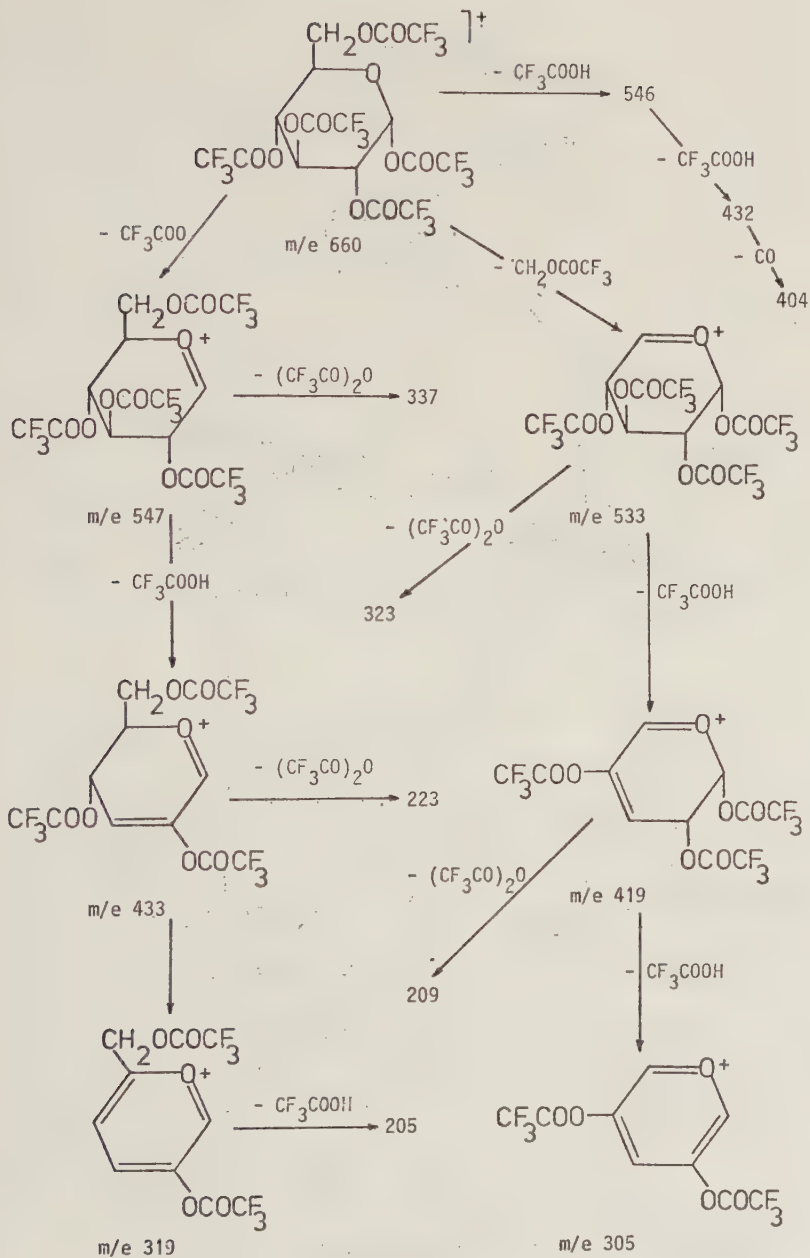
Aber auch die Unterscheidung zwischen freier und glycosidisch gebundener Hexose ist an Hand der folgenden, direkt vom Moleküllion der freien Species ausgehenden Ionen möglich:

$[M - F]^+$	m/e 641
$[M - OOCF_3]^+$	m/e 563
$[M - CF_3COOH]^+$	m/e 546
$[M - (CF_3CO)_2O]^+$	m/e 450
$[M - CF_3COOH - CF_3CO]^+$	m/e 449
$[M - 2CF_3COOH]^+$	m/e 432
$[M - CF_3COOH - CF_3COO-CH_2-CHO]^+$	m/e 390

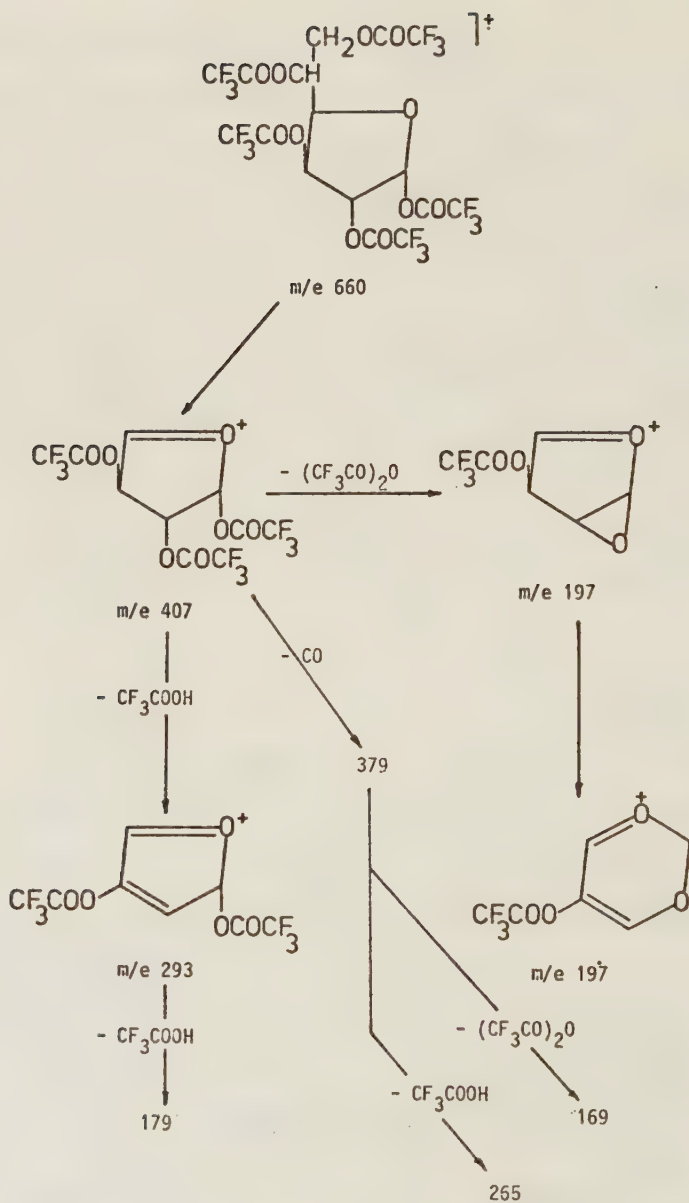
Als Beispiel für das Massenspektrum eines trifluoracetylierten Disaccharids sei Abb. 53, das Spektrum von Saccharose-TFA, angeführt.

Während Saccharose in einem Vergleichstest nach 19 Std. Einwirkungsdauer von $(CF_3CO)_2O$ vollständig umgesetzt war, gelang dies bei Trehalose auch nach 65 Std. nicht zu 100%. Hier treten auch unvollständig trifluoracetylierte Formen auf. Anscheinend ist die sterische Hinderung bei zwei Pyranoseringen so groß, daß die am ungünstigsten placierte OH-Gruppe underivatisiert bleibt.

Die Fragmentierung von Saccharose-TFA ergibt sich aus Sche-



Schema 21: Glucose-TFA (Pyranoseform)



Schema 22: Glucose-TFA (Furanoseform)

ma 23.

Abb. 54 zeigt das Derivatspektrum von SIPHULA ceratites bei 150°C Einlaßtemperatur.

Der Peak m/e 451 deutet auf eine freie OH-Gruppe und legt somit nahe, daß ein Disaccharid aus 2 Pyranosen - zumindest als Hauptkomponente, wenn auch nicht unbedingt ausschließ-lich - in der Flechte zu finden ist.

Das TFA-Spektrum bei 55°C besteht zum größten Teil aus Pen-tit und Hexit, neben wenig freier Hexose in Pyranoseform (m/e 407 als Charakteristikum für Furanoseformen fehlt). Bei 105°C Verdampfungstemperatur tritt bereits das Disaccha-rid stärker auf als die Polyole, und die freie Hexose ist schon verschwunden.

* Dieser Temperaturverlauf entspricht der Flüchtigkeit der untersuchten Verbindungen.

Einige der oben genannten Fragmentierungswege von Mono- und Disacchariden finden ihre Bestätigung in den kürzlich von W. A. König et al. ¹¹⁹⁾¹²⁰⁾ veröffentlichten Arbeiten.

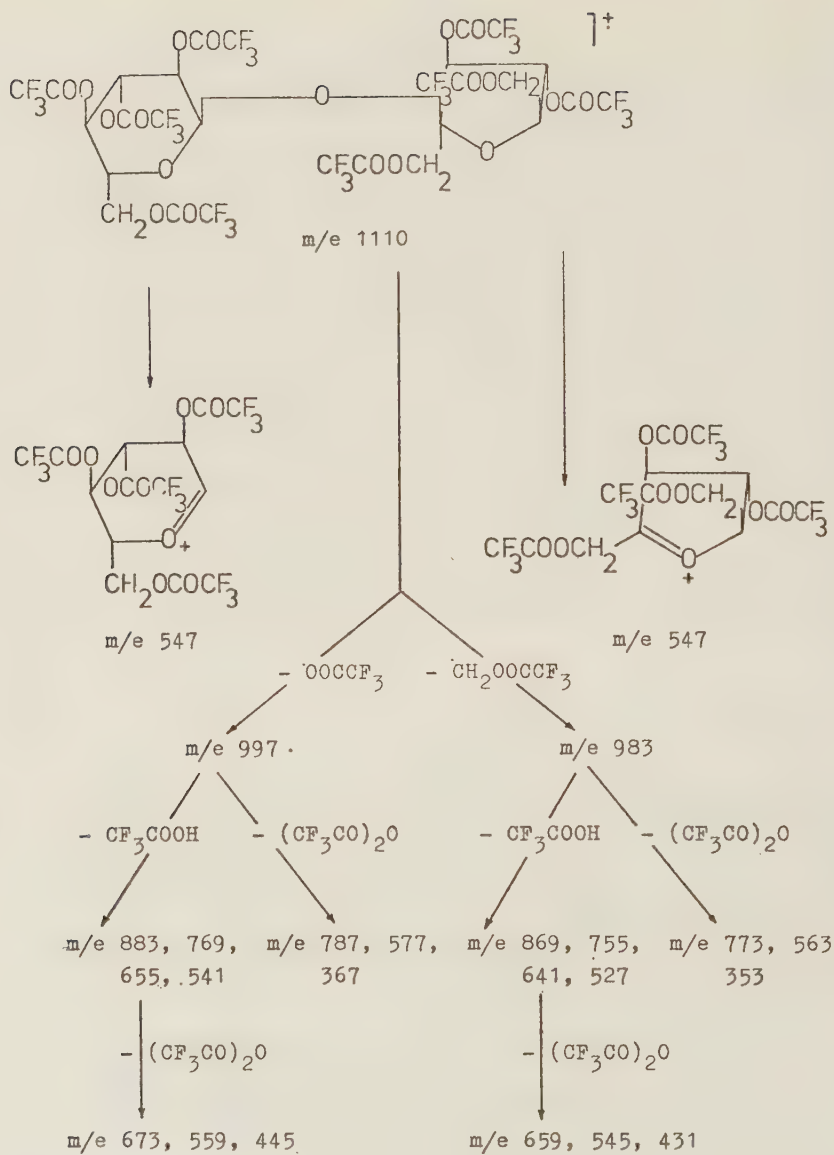
c) Glycoside von Zuckeralkoholen

Als Beispiel für eine Flechte mit Polyolglycosiden sei zu-nächst UMBILICARIA pustulata angeführt. Hier läßt sich am Temperaturverlauf der TFA-Derivatspektren die ganze Palette der Kohlenhydrate sukzessive an Hand der unterschiedlichen Flüchtigkeit vorstellen.

In Abb. 55 erkennt man bei 57°C Einlaßtemperatur Pentit, Hexit und Hexose, andeutungsweise auch schon ein Glycosid aus einer Hexose und einem Pentit.

Bei 105°C ist die freie Hexose (m/e 563) verschwunden (Abb. 56); der Peak 451 legt ein Disaccharid aus 2 Hexopyranosen nahe. Die Intensität des freien Pentits und Hexits ist kleiner geworden (vgl. das Verhältnis von m/e 505 : 519), das Polyolglycosid stärker hervorgetreten.

Bei 155°C (Abb. 57) schließlich sind m/e 519 und m/e 547,



Schema 23: Saccharose-TFA

die beide durch eine zentrale Spaltung des Glycosids entstehen - wie man dem Fragmentierungsschema (Schema 24) entnehmen kann - bereits nahezu gleich groß geworden. Nun scheint die ideale Verdampfungstemperatur für das Glycosid erreicht zu sein. Daß die Hexose in Furanoseform vorliegen muß, folgt aus der hohen Intensität von m/e 829 (Abspaltung der Seitenkette und Bildung eines stabilen cyclischen Oxoniumions). Die Verknüpfungsstelle im Polyolteil läßt sich dagegen nicht so leicht festlegen. Im Fragmentierungsschema wurde die Verknüpfung in 2-Stellung gewählt, der von B. Lindberg ¹²¹⁾¹²²⁾¹²³⁾ bewiesenen Struktur gemäß.

Dieses Glycosid - Umbilicin genannt - wurde von Lindberg aus *Lasallia pustulata*, *Cetraria islandica* und anderen Flechten isoliert.

Das Spektrum bei 155°C zeigt außerdem einen Anstieg der Intensität von m/e 451; also ist auch für das Disaccharid diese Verdampfungstemperatur günstiger.

In Abb. 58 ist das TFA-Derivatspektrum von *PELTIGERA horizontalis* bei T = 120°C dargestellt.

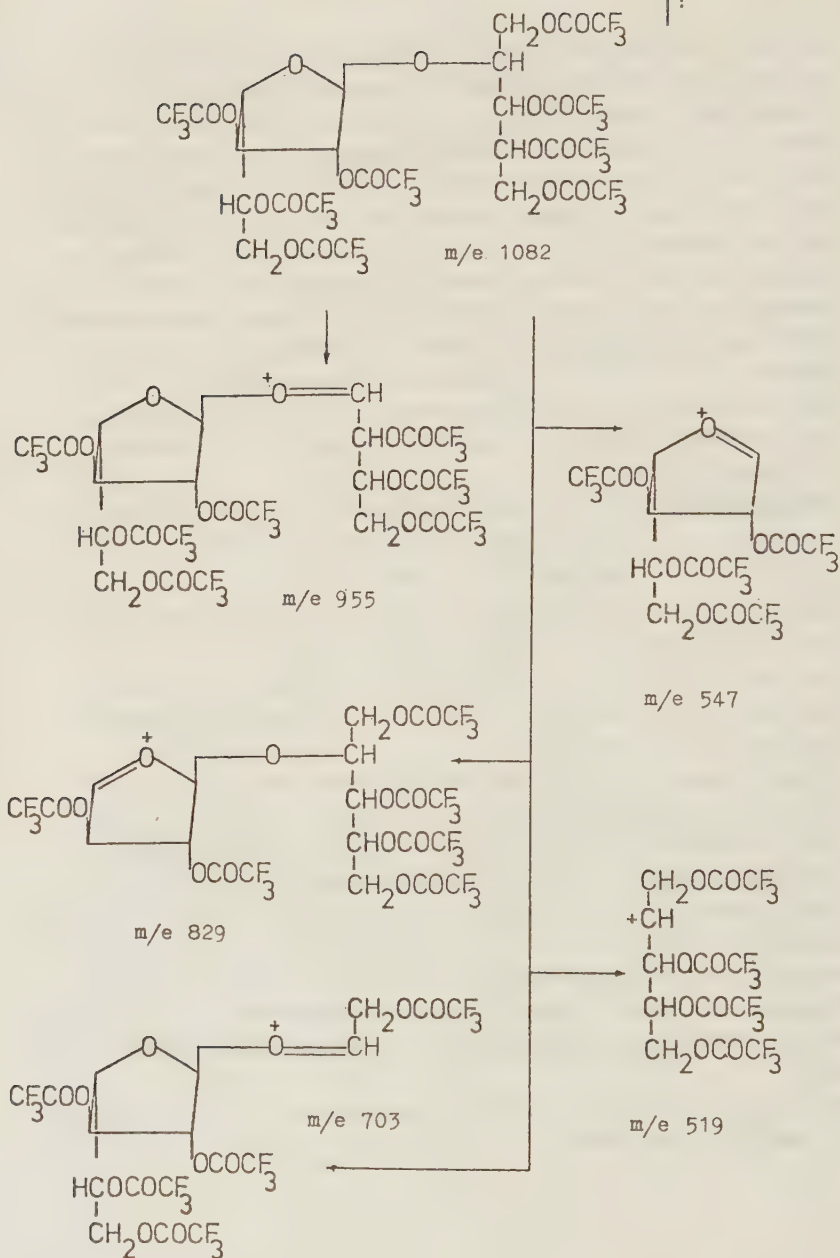
Hier entspricht nun m/e 645 dem Peak 519 bei Umbilicin, d.h. in diesem Polyolglycosid ist statt des Pentitrestes ein Hexit eingebaut.

Ob die Hexose als Furanose oder Pyranose vorliegt, soll hier nicht entschieden werden, da von B. Lindberg ¹²⁴⁾¹²⁵⁾ bzw. G. Pueyo ¹²⁶⁾ beide Verbindungen - 3-O-β-D-Glucopyranosyl-D-mannit und 3-O-β-D-Galactofuranosyl-D-mannit (*Peltigerosid*) - aus *Peltigera horizontalis* isoliert wurden.

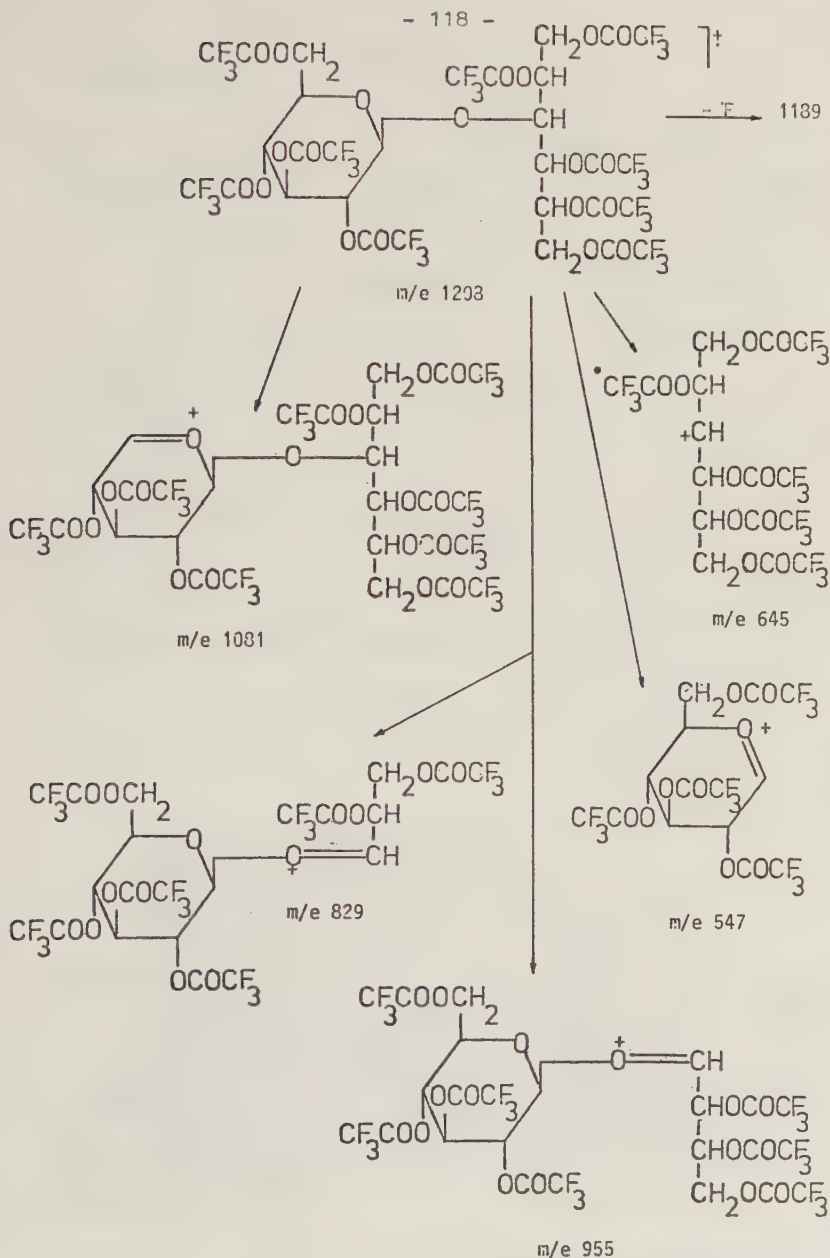
Wie man Abb. 58 außerdem entnehmen kann, enthält diese Flechte noch Pentit, Hexit und ein Disaccharid aus 2 Hexosen. Bei niederen Einlaßtemperaturen tritt noch freie Hexose auf.

Die Fragmentierung der beiden Polyolglycoside ist aus Schema 25 und 26 zu ersehen.

1⁺



Schema 24: Umbilicin



Schema 25: 3-O-B-D-Glucopyranosyl-D-mannit-TFA



d) Polysaccharide

Polysaccharide, die wichtige Gerüstfunktionen innerhalb der Pflanze einnehmen, können auch nach der Derivatisierung nicht massenspektrometrisch untersucht werden.

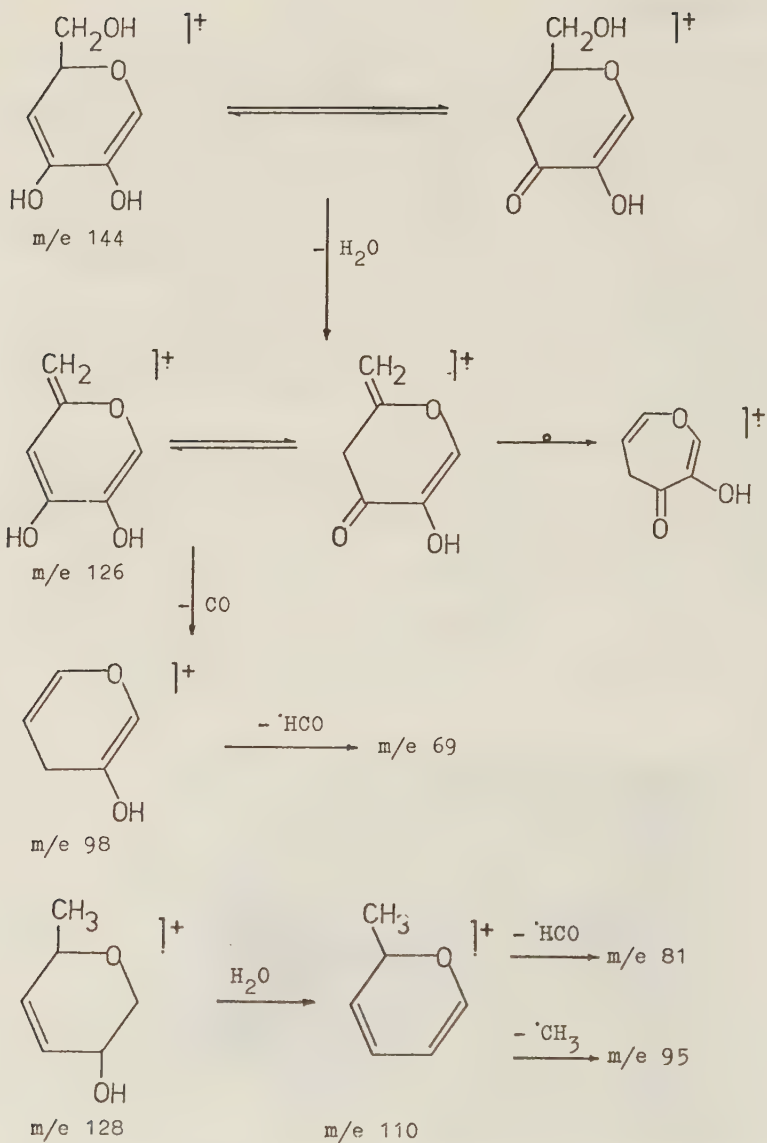
Bei starker thermischer Belastung werden jedoch einzelne Teile der Kette abbrechen, so daß bei allen Flechten-Derivatspektren bei hohen Einlaßtemperaturen Polysaccharidfragmente - erkenntlich z.B. an m/e 547 - auftreten. Das bedeutet, daß die Polymeren aus Hexosen aufgebaut sind.

Polysaccharide bleiben auch übrig nach der Extraktion mit verschiedenen unpolaren Lösungsmitteln. Sie können aber auch direkt mit Wasser oder basischen Lösungen aus der Flechte gewonnen werden.

Weitergehende Untersuchungen wurden hier nicht vorgenommen. Nur bei der Flechte *USNEA chaetophora* wurde ein Massenspektrum - ohne vorherige Derivatisierung - einer weißen Gerüstsubstanz aufgenommen (Abb. 60), die korallenartig stehen bleibt, wenn man die "grünen Bestandteile" abstreift. Abb. 61 zeigt Teile dieser Flechte vor dem restlosen Entfernen der äußeren Hülle. Einige der thermischen Abbauprodukte und ihre Fragmentierungswege sind in Schema 27 zusammengestellt.



Abb. 61: Gerüstsubstanz von *USNEA chaetophora*



Schema 27: Gerüstsubstanzen (thermisch abgebaut)

Die CHN-Analyse ergab folgende Werte (kein Verbrennungsrückstand!):

C:	40,23%	/	44,44%	/	40,00%
H:	6,51%	/	6,17%	/	6,67%
N:	0,19%	/	-	/	-
O:	53,07%	/	49,38%	/	53,33% (Differenz)

In der zweiten Spalte sind die berechneten Werte für $(C_6H_{10}O_5)_n$ angegeben. Die gefundenen Daten stimmen gut überein mit $(C_6H_{10}O_5 + H_2O)_n$ (dritte Spalte). Der Stickstoffgehalt von 0,19% könnte dadurch hervorgerufen werden, daß in jeder 40. Grundeinheit eine OH-Gruppe durch eine NH_2 -Gruppe ersetzt ist.

2. Andere Derivatisierungsverfahren

Die Methylierung der Kohlenhydrate in der Gesamtflechte erwies sich als ungeeignet, da die Molekulargewichte der erhaltenen Derivate so niedrig sind (bei Pentiten ist $M = 222$), daß alle wesentlichen Fragmente in den schon überfüllten Bereich (alle anderen Inhaltsstoffe werden ebenfalls flüchtiger) unterhalb m/e 200 fallen und sich damit der Identifizierung entziehen.

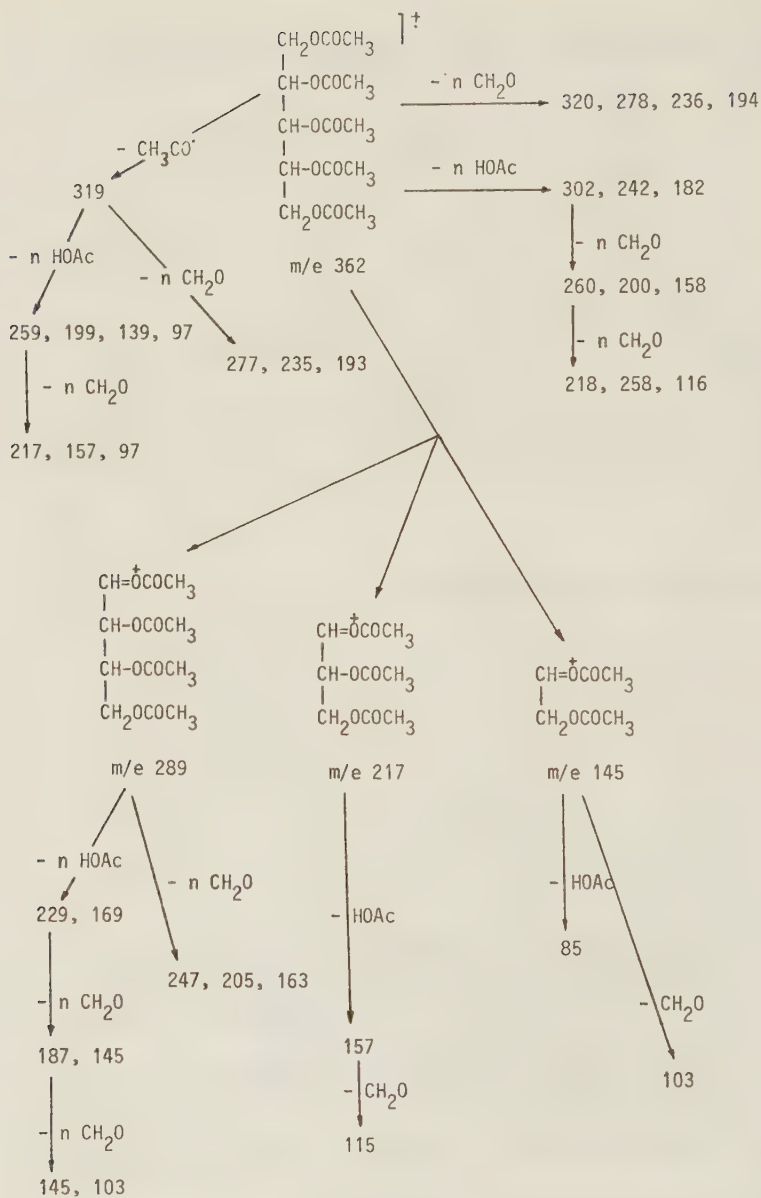
Die Acetylierung entspricht im wesentlichen der Trifluoracetylierung.

Zur Verdeutlichung der schon eingangs erwähnten Unterschiede sei auf Abb. 62 verwiesen - *PSEUDOCYPHELLARIA aurata* umgesetzt mit Acetanhydrid. Die Fragmentierung von Pentitacetat ist in Schema 28 dargestellt.

Zum Vergleich betrachte man Abb. 49 und Schema 19 bei den entsprechenden TFA-Derivaten.

Wesentlich leistungsfähiger erwies sich dagegen die Silylierung.

Auch wenn bei diesem Verfahren alle nur denkbaren OH-Grup-



Schema 28: Arabit-Acetat

pen umgesetzt werden, so bleibt doch ein schmales Temperaturband um 20°C , bei dem im Massenspektrum praktisch nur silylierte Kohlenhydrate - allerdings hier nur die am leichtesten flüchtigen Zuckeralkohole - erscheinen.

In Abb. 64 - RAMALINA duriaeri derivatisiert mit BSTFA - erkennt man die in Schema 29 beschriebenen Fragmente silylierten Pentits.

Über Spektren und Zerfallswege silylierter Zuckeralkohole berichten auch G. Petersen ¹²⁷⁾ und M. Dizdaroglu ¹²⁸⁾.

Diese beiden Arbeitsgruppen vermessen jedoch die TMS-Derivate über eine GC/MS-Kombination, wobei infolge thermischer Belastung als höchste Peaks nur die $[\text{M} - \text{HOSiMe}_3]^+$ -Signale auftreten, während bei dem hier verwendeten Direkteinlaß auch das Molekülion sowie $[\text{M} - \text{CH}_3]^+$ zu beobachten sind.

Alle bisher untersuchten Derivatisierungsmethoden verwendeten "einzähnige Liganden". Daher waren isomere Verbindungen nur zu unterscheiden, wenn ihr Aufbau Anlaß zu unterschiedlichen Fragmentierungswegen gab - Beispiel Furanose/Pyranose. Isomere Pentite konnte man dagegen nicht erkennen. Es war also unmöglich, massenspektrometrisch Arabit und Ribit auseinander zu halten.

Um auch hierfür eine Lösung zu finden, wurden "zweizähnige Liganden" untersucht, die prinzipiell in der Lage sein müßten, die Stereochemie zu unterscheiden.

Als erstes bot sich hier die Umsetzung mit Aceton unter Säurekatalyse an, bei der Isopropylidenderivate entstehen. Derivatisierungen an der Gesamtflechte erwiesen sich jedoch als nicht erfolgreich, da die erhaltenen Verbindungen wenig intensive Fragmentationen im Bereich unterhalb m/e 200 liefern, zudem noch bei mittleren Meßtemperaturen (ca. 60°C). Bessere Ergebnisse erzielt man, wenn man Acetonextrakte untersucht, bei denen unter Katalyse der sauren Inhaltsstoffe Isopropylidenderivate gebildet werden. Die Reaktion verlief hier vollständiger als bei der Derivatisierung von reinem Arabit mit Aceton/1% H_2SO_4 .

In Abb. 63 ist der Acetonextrakt von CETRARIA islandica

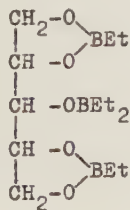
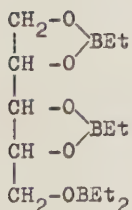
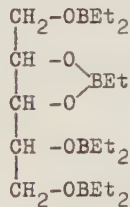
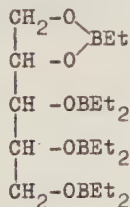
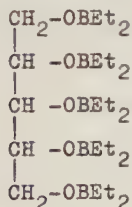
nach Entfernen der sekundären Stoffwechselprodukte mit Äther dargestellt. Die Fragmentierung von Isopropyliden-Arabit ist Schema 30 zu entnehmen.

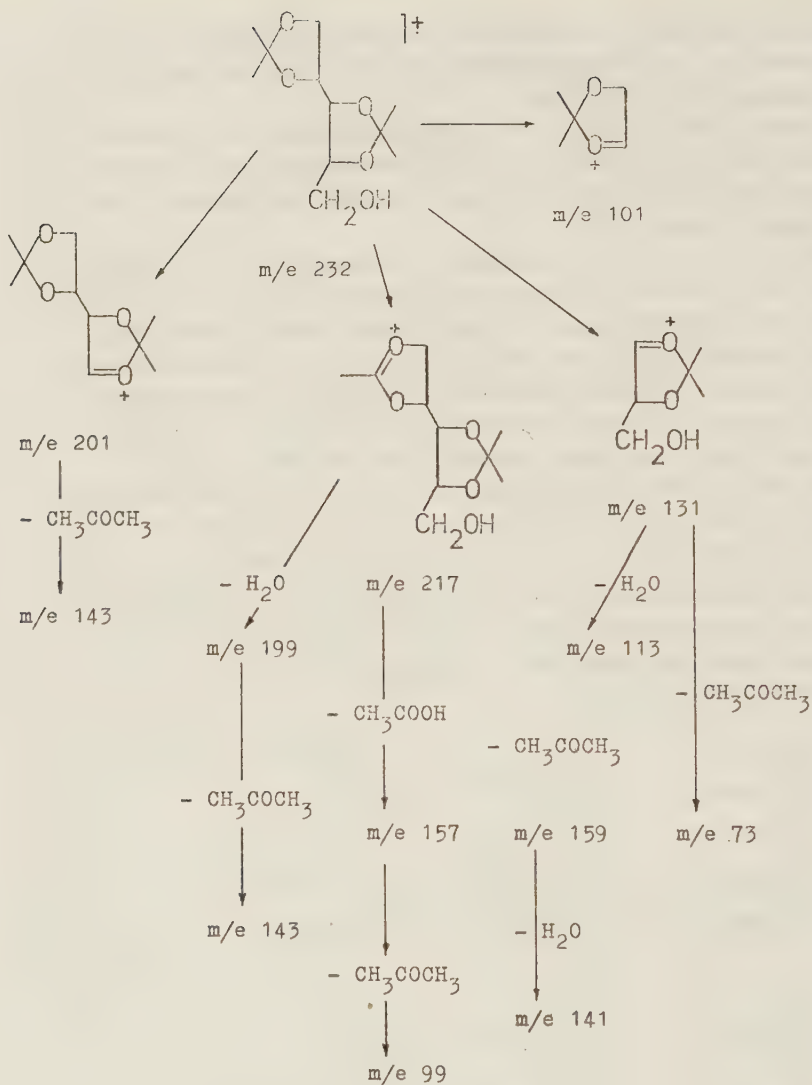
Da jedoch anscheinend keine einheitliche Umsetzung stattfindet (m/e 177 enthält nur 1 Acetonmolekül) und Spektren nur aus Extrakten möglich sind, wurden keine weiteren Untersuchungen vorgenommen.

Auch die Reaktion von Arabit-TFA mit Aceton war kein gangbarer Weg, da hier die günstigste Umsetzungszeit genau eingehalten werden muß. Bei zu kurzer Einwirkung findet keine Umdervatisierung statt, bei längerer Dauer werden alle TFA-Gruppen verdrängt. Das gewünschte Produkt - 4 OH-Gruppen durch Aceton besetzt, 1 OH-Funktion trifluoracetyliert - entsteht immer nur neben anderen Verbindungen.

Setzt man Isopropyliden-Arabit mit Trifluoressigsäureanhydrid um, so werden alle Aceton-Gruppen durch TFA verdrängt, und es bildet sich die vollständig acetylierte Species.

Bei der Reaktion von Arabit mit Triäthylboran, bei der das Derivatisierungsmittel sowohl "einzähnig" als auch "zweizähnig" reagieren kann (vgl. Abb. 59), entstehen theoretisch folgende Verbindungen:





Schema 30: Bis(isopropyliden)arabitol

Hauptprodukt sind die beiden Verbindungen, bei denen BEt_3 zweimal "zweizählig" eingebaut ist. Die Entscheidung für eines der beiden Isomeren ist jedoch aus dem Massenspektrum nicht möglich, da die jeweils signifikanten Bruchstücke mit anderen Fragmenten zusammenfallen.

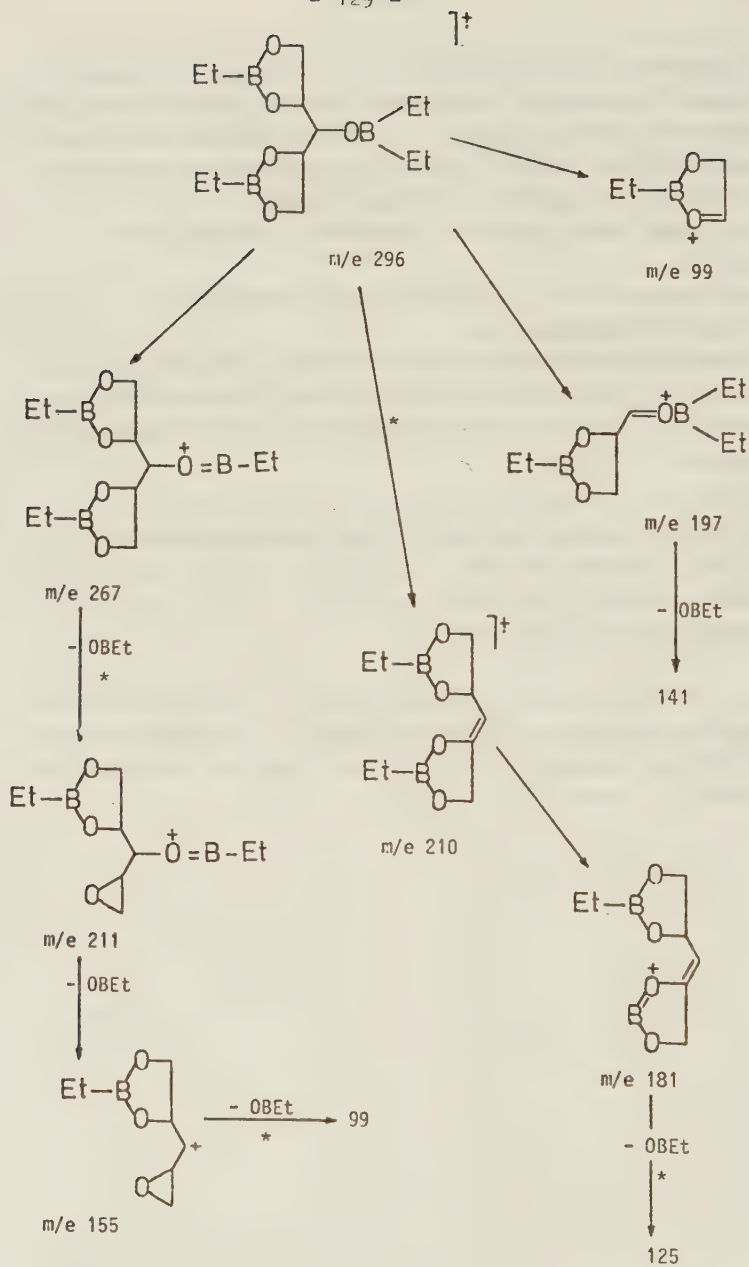
Ein Ausweg wäre hier die Verwendung anderer Trialkylborane.

Die Fragmentierung der beiden Hauptprodukte ist in Schema 31 und 32 dargestellt.

Im Derivatspektrum von Gesamtflechten sind die umgesetzten Zucker trotz der Überlagerung mit Fragmenten aus anderen Inhaltsstoffen am typischen Bor-Isotopenmuster zu erkennen.

Vor kurzem erschienen Arbeiten von R. Köster et al. ¹²⁹⁾¹³⁰⁾, der Mannit und Sorbit mit Triäthylboran reagieren ließ und bei Raumtemperatur in 100% Ausbeute das "einzähnige" Produkt erhielt, das sich bei 180°C in das "zweizähnige" umwandelte (Ausbeute 97%).

Eine Zusammenfassung der durch TFA-Derivatspektren gewonnenen Kohlenhydrate kann aus Tabelle 5 entnommen werden. Die in der Literatur ¹³¹⁾¹³²⁾ zu findenden Angaben sind ebenfalls enthalten.



Schema 31: Arabitol + Triäthylboran

Tabelle 5: Kohlenhydrate

Flechte	gefunden	Literatur
CLADONIA coniocraea	Pentit, Hexit, Disaccharid (Hexosen)	
deformis	Pentit, Hexit	
furcata	Pentit, Hexit, Hexose, Disaccharid (Hex.)	Glucose, Mannit, Glucoside
impexa	Pentit, Hexit, Tetrit (Sp.), Disacch. (Hex.)	D-Arabit, Mannit
uncialis	Pentit, Hexit, Hexose, Disacch. (Hex.)?	Arabit, Mannit
rangiferina	Pentit, Hexit, Disaccharid (Hexosen)	Arabit, Mannit, Saccharose, Trehalose
mitis	Pentit, Hexit, Inosit, Disaccharid (Hex.)	
digitata	Pentit, Hexit	
squamosa	Pentit, Hexit, Disaccharid (Hexosen)	
pyxidata	Pentit, Hexit, Disaccharid (Hexosen)	
mediterranea	Pentit, Hexit, Hexose, Disacch. (Hex.)	
major	Pentit, Hexit, Hexose, Disacch. (Hex.)	
PSEUDOCYPHELLARIA aurata	Pentit, Hexit	
PELTIGERA canina	Pentit, Hexit, Hep- tit	Glucose, D-Mannit, 3-O-B-D-Glucopyranosyl-D-mannit
rufescens	Pentit, Hexit, Disacch. (Hex.), Glycosid (Hexit + Hexose)	Glucose, Mannit Saccharose, Trehalose, Mannitgalactosid, 3-O-B-D-Glucopyranosyl-D-mannit

Tabelle 5: Kohlenhydrate

Flechte	gefunden	Literatur
PELTIGERA aphthosa	Pentit, Hexit, Inosit (Sp.), Disaccharid (Pyran. + Furan.)	Arabit, Ribit, D-Mannit, Glucose, Fructose, myo-Inosit, Saccharose, 3-O-β-D-Glucopyranosyl-D-mannit
horizontalis	Pentit, Hexit, Hexose, Disacch. (Hex.), Glycosid (Hexose + Hexit)	Glucose, Mannit, 3-O-β-D-Galactofuranosyl- u. Glucopyranosyl-D-mannit
XANTHORIA aureola	Pentit, Hexit, Tetrarit (?), Inosit (Sp.) Xantholamin	Arabit, Mannit, Ribit, Saccharose
parietina	Pentit, Hexit, Hexose (Pyran.), Inosit (Sp.), Xantholamin	Arabit, Fructose, Galactose, Glucose, Mannit, Saccharose, Xantholamin
PSEUDEVERNIA furfuracea	Pentit, Hexit, Hexose, Inosit (?), Disacch. (Pyr. + Fur.)	Arabit, Erythrit, Mannit, Ribit
STEREOCAULON vesuvianum	Pentit, Hexit, Hexose, Umbilicin	
CETRARIA islandica	Pentit, Hexit	
SIPHULA ceratites	Pentit, Hexit, Disaccharid (Hexosen)	1-Desoxy-D-glycero-D-taloheptit
DERMATOCARPON minutum	Hexit, Heptit, Hexose, Disacch. (Pyran. + Furanose)	D-Mannit, Sorbit, Saccharose, Trehalose, D-Volemit
UMBILICARIA pustulata	Pentit, Hexit, Inosit (?), Hexose, Disacch. (2 Pyran.), Umbilicin, Xantholamin (Sp.)	Arabit, D-Mannit, Ribit, Saccharose, Trehalose, Umbilicin
PARMELIA tiliacea	Pentit, Hexit	

Tabelle 5: Kohlenhydrate

Flechte	gefunden	Literatur
PLATISMATIA glauca	Pentit, Hexit, Inosit (?), Hexose, Disacch. (Hexosen)	Arabit, Mannit
RAMALINA duriaeri	Pentit, Hexit	
USNEA chaetophora	Pentit, Hexit, Tetrit	

Tabelle 6: massenspektrometrisch identifizierte sekundäre Inhaltsstoffe

Flechte	Fundort/jahr	gefunden	Literatur
CLADONIA coniocraea	Frankenwald (Rothenkirchen) August 1973	Fumarprotocetrarsäure Usninsäure (Sp.)	Fumarprotocetrarsäure
deformis	Frankenwald (Rothenkirchen) August 1973	Usninsäure, Zeorin, Taraxerol, Taraxeron, Taraxeren	Usninsäure, Isousninsäure, Zeorin, Taraxeren, Belli- diflorin, Rhodocladonsäure
furcata	Frankenwald (Rothenkirchen) August 1973	Fumarprotocetrarsäure	Fumarprotocetrarsäure, Atranorin
impexa	Reichswald (Nürn- berg) Oktober 1972	Perlatolsäure, 2'-O- Methylperlatolsäure, Pulvinsäure (Sp.)	Perlatolsäure, Usninsäure, Ursolsäure
uncialis	Reichswald (Nürn- berg) Oktober 1972	Squamatsäure, 2'-O- Methylsquamatsäure, Usninsäure	Squamatsäure, Usninsäure
rangiferina	1. Bruck/Oberpfalz Okt. 1970 2. Reichswald (Nbg.) Okt. 1972	Atranorin (1. u. 2.)	Atranorin, Fumarproto- cetrarsäure

Tabelle 6: massenspektrometrisch identifizierte sekundäre Inhaltsstoffe

Flechte	Fundort/jahr	gefunden	Literatur
CLADONIA mitis	Reichswald (Nürnberg)	Usninsäure, Atranorin (Sp.)	Usninsäure, Isousninsäure, Psoromsäure, Rangiformsäure, Norrangiformsäure
digitata	Oktober 1972 Frankenwald (Rothenkirchen) August 1973	Thamnolsäure, Decarboxy-thamnolsäure, 2'-O-Methyl- u. 2',4'-O-Dimethyldecarboxythamnolsäure	Thamnolsäure, Decarboxy-thamnolsäure, Bellidiflorin, Rhodocladonsäure
squamosa	Frankenwald (Rothenkirchen) August 1973	Squamatsäure, 2'-O-Methylsquamatsäure	Squamatsäure
pyxidata	Unteres Taubertal September 1974	Fumarprotocetrarsäure, Usninsäure	Fumarprotocetrarsäure, Atranorin
mediterranea	Kanarische Inseln September 1974	Atranorin, Vulpinsäure (Sp.), Pulvinsäure (Sp.)	Usninsäure, Perlatolsäure
major	?	Fumarprotocetrarsäure	Fumarprotocetrarsäure
tenuis	Erlangen September 1975	Usninsäure, Fumarprotocetrarsäure, Hypoprotocetrarsäure (Sp.), Virenssäure (Sp.)	Usninsäure, Fumarprotocetrarsäure

Tabelle 6: massenspektrometrisch identifizierte sekundäre Inhaltsstoffe

Flechte	Fundort/jahr	gefunden	Literatur
CLADONIA convoluta	Unteres Taubertal September 1974	Fumarprotocetrarsäure, Usninsäure	Fumarprotocetrarsäure, Usninsäure
gracilis	Reichswald (Nürnberg) Oktober 1972	Fumarprotocetrarsäure	Fumarprotocetrarsäure, Atranorin
PSEUDOCYPHELLARIA aurata	Kanarische Inseln September 1974	Pulvinsäurelacton, Calycin, unbek. Verbind. (m/e 498, 482, 442, 440, 424, 409, 355, 340, ...)	Pulvinsäurelacton, Pulvinsäure, Calycin
PELITIGERA canina	Unteres Taubertal September 1974	unbek. Verb. (m/e 377, 283, 273, 243, 238, 212, 194 = 212 - H ₂ O, 167)	Peltigerin
rufescens	Unteres Taubertal September 1974	keine sek. Inhaltsstoffe	Peltigerin, Zeorin
aphthosa	Torne Lappmark Jukkasjärvi 1936	Peltigerin, Phlebsäure A u. B, Fumarprotocetrarsäure, 15 α -Acetoxystyrol, 22-hydroxyhopan (?)	Peltigerin, Phlebsäure A u. B

Tabelle 6: massenspektrometrisch identifizierte sekundäre Inhaltsstoffe

Pflechte	Fundort/Jahr	gefunden	Literatur
PELTIGERA horizontalis	Småland Svennarum März 1927	Peltigerin, Zeorin, unb. Verb. (m/e 500, 482 zin, = 500 - H ₂ O, 457, 455, u. B 439, 436) = Scabrosin ?	Peltigerin, Dolichorrhini- zeorin, Scabrosin A
XANTHORIA aureola	1. Cap d'Agde (Fr.) Sept. 1974 2. Unt. Taubertal Sept. 1974	1. u. 2.: Diterpen C ₂₀ H ₃₂ , Emodin, Parietin, Parietinsäure, Telos- schistin u./o. Emodin- säure	Emodin, Parietin, Emodin- säure, Parietinsäure, Ci- treorosein, Fallacinal, Teloschistin
parietina	1. Cap d'Agde (Fr.) Sept. 1974 2. Unt. Taubertal Sept. 1974	1. u. 2.: C ₂₀ H ₃₂ , Pari- etin, Emodin, Fallaci- nal (Sp.), Teloschistin (Sp.)	Atranorin, Emodin, Falla- cinal, Parietin, Parietin- säure, Teloschistin
PSEUDEVERNIA furfuracea	1. Dolomiten August 1976 2. Pyrenäen Sept. 1975 3. Forêt de l'Hos- pedale (Kors.) Sept. 1975	Anreicherung nur bei 1., sonst 1. = 2. = 3. Atranorin, Chloratranorin, Physodsäure, 4-O-Methyl- u. 3-Hydroxy- physodsäure, Alektoron- säure, Hydroxyalektoron- säure, 2 Tripepsidone, 1 Depsidon	Atranorin, Chloratranorin, Physodsäure, Fumarprotoce- tronsäure, Imbricansäure, Microphyllinsäure, Usnin- säure

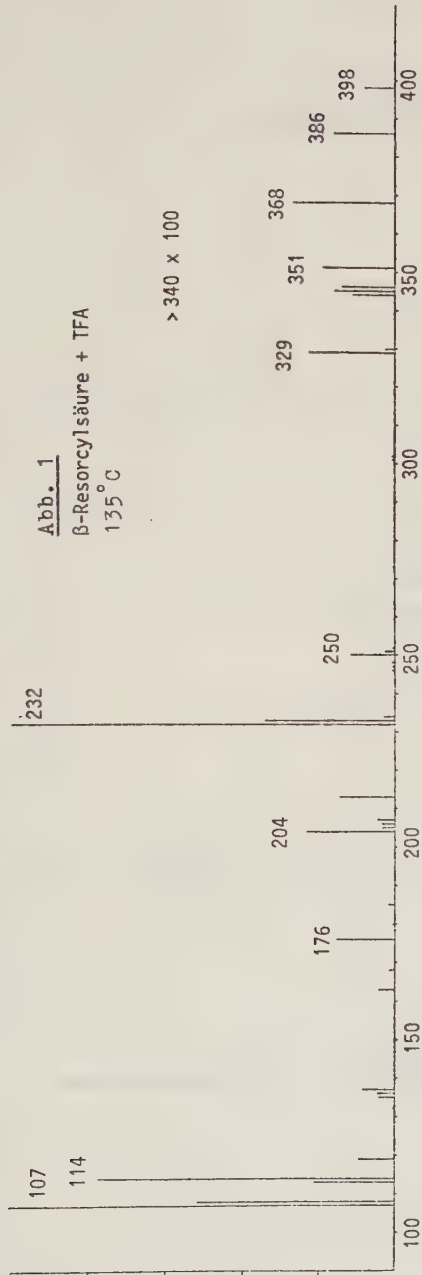
Tabelle 6: massenspektrometrisch identifizierte sekundäre Inhaltsstoffe

Flechte	Fundort/jahr	gefunden	Literatur
STEREOCAULON vesuvianum	Vesuv	Atranorin, Methyl- β - orcinolcarboxylat (?)	Atranorin, Stictinsäure
CETRARIA islandica	April 1975	Fumarprotocetrarsäure,	Fumarprotocetrarsäure,
	Erlangen	Hypoprotocetrarsäure	Protolichesterinsäure,
	Mai 1975	(Sp.), Virensäure (Sp.)	Atranorin, Erythrin, Ever-
		Protolichesterinsäure	ninsäure, Gyrophorsäure,
			Microphyllinsäure, Usninsäure
SIPHULA ceratites	Finmark Porsanger	Siphulin	Siphulin
	August 1968		
DERMATOCARPON miniatum	Dalsland Bäche	keine sek. Inhaltsstoffe	keine sek. Inhaltsstoffe
	August 1933		
UMBILICARIA pustulata	Västmanland Arboga	Orsellinsäure, Gyro-	Gyrophorsäure, Lecanor-
	Januar 1947	phorsäure (?)	säure
PARMELIA tiliacea	Porto Vecchio (Kor-	Atranorin, Chloratran-	Atranorin, Lecanorsäure
	sika)	rin, Lecanorsäure, Us-	
	September 1975	ninsäure (Sp.), C ₂₀ H ₃₂	
taractica	Porto Vecchio	Usninsäure, Stictin-	Atranorin, Usninsäure,
	September 1975	säure, Norstictinsäure,	Salazinsäure
		Salazinsäure	

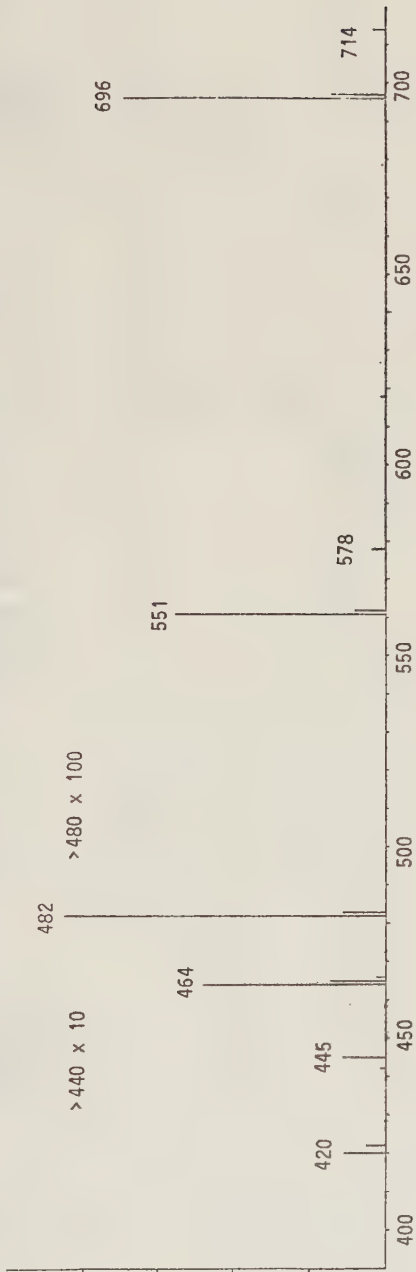
Tabelle 6: massenspektrometrisch identifizierte sekundäre Inhaltsstoffe

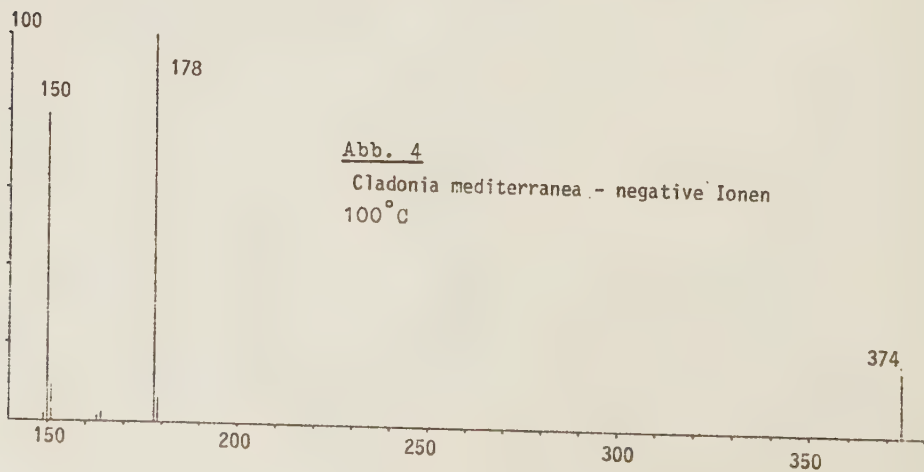
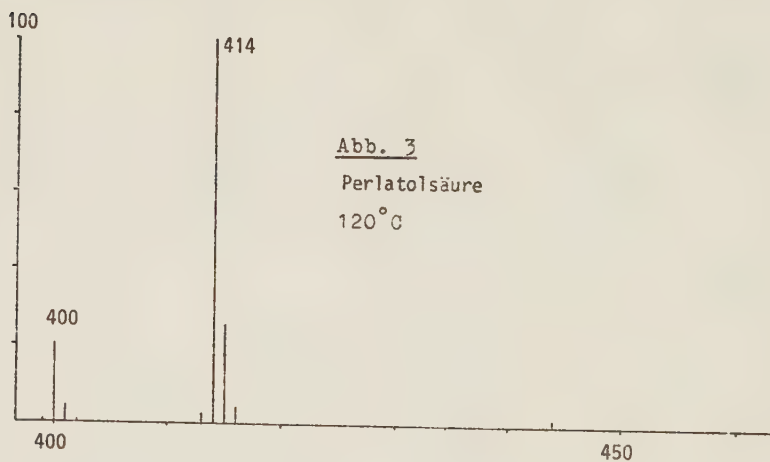
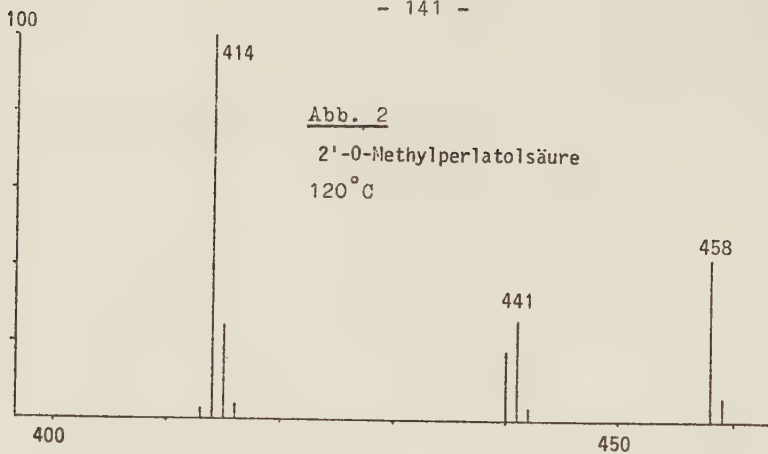
Flechte	Fundort/jahr	gefunden	Literatur
PLATISMATIA glauca	Forêt de l'Hos- pedale (Kors.) September 1975	Usninsäure, Caperatsäu- re, Fumarprotocetransäu- re, Hypoprotocetransäu- re, Physodsäure, 4-O- Methyl- u. 3-Hydroxy- physodsäure, Atranorin, Chloratranorin	Atranorin, Caperatsäure
USNEA chaetophora	Dolomiten August 1976	Usninsäure, Dihydroxy- formyl- u. Dihydroxy- methyl- u. Trihydroxy- methyl(?) -phthalid, Stictinsäure, Norstic- tinsäure, Salazinsäure, Diterpen C ₂₀ H ₃₂	keine Angaben

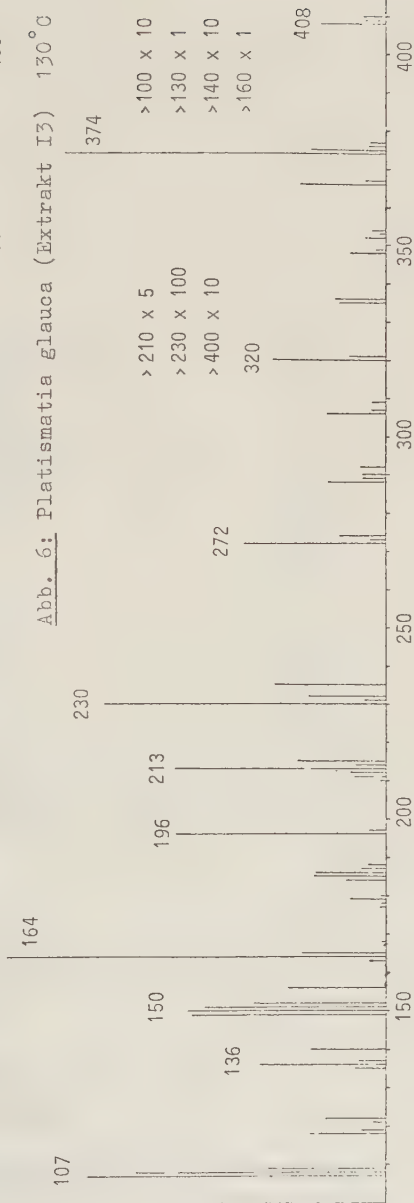
100

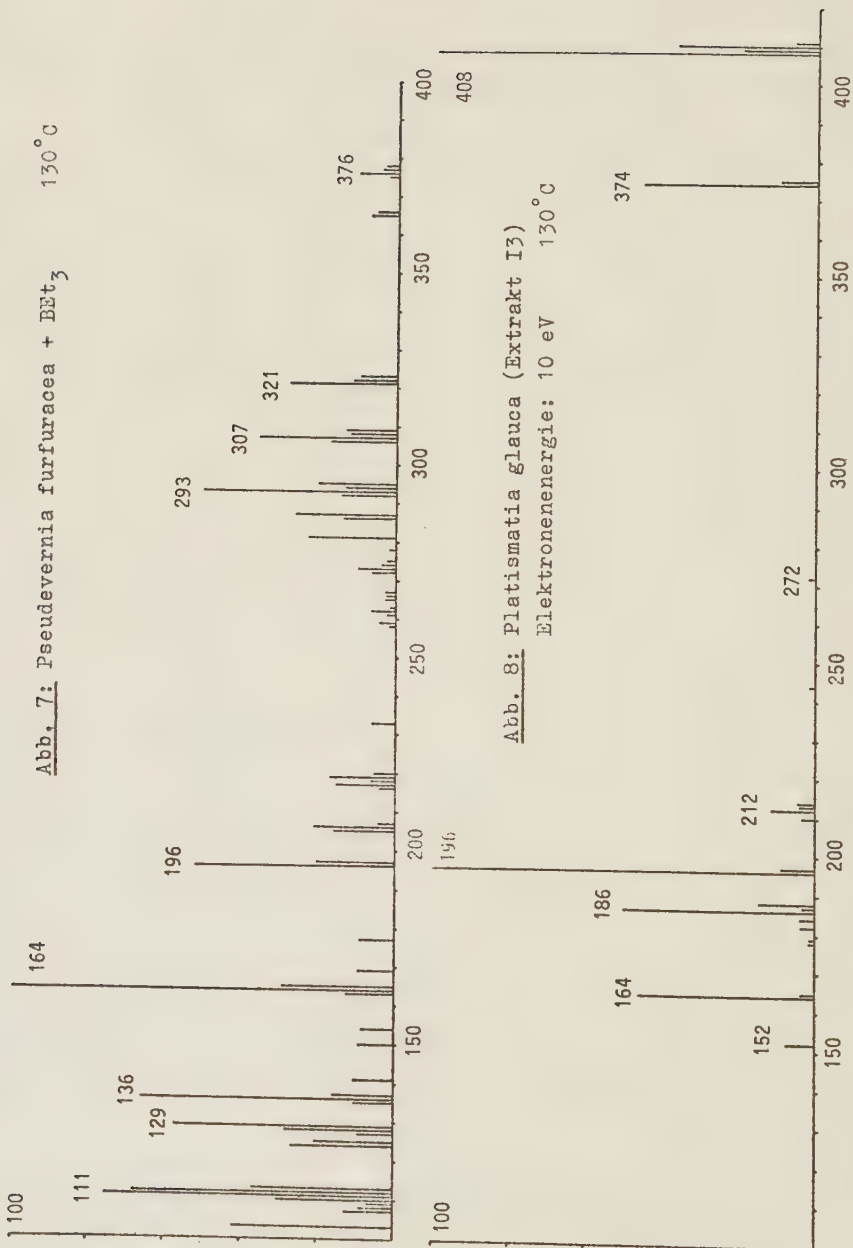


- 140 -









11

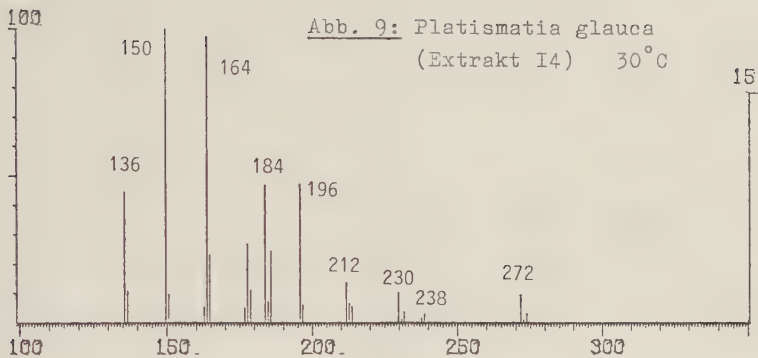
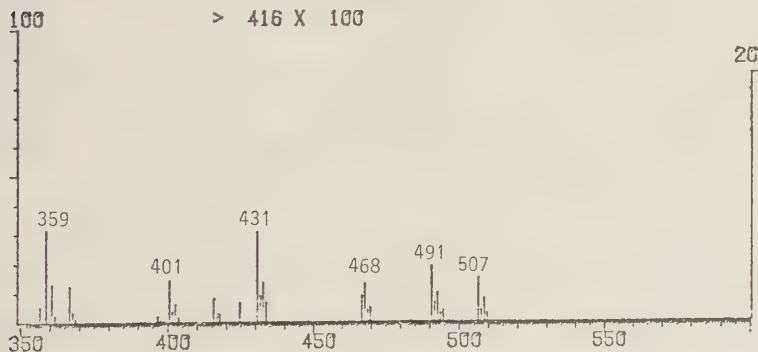
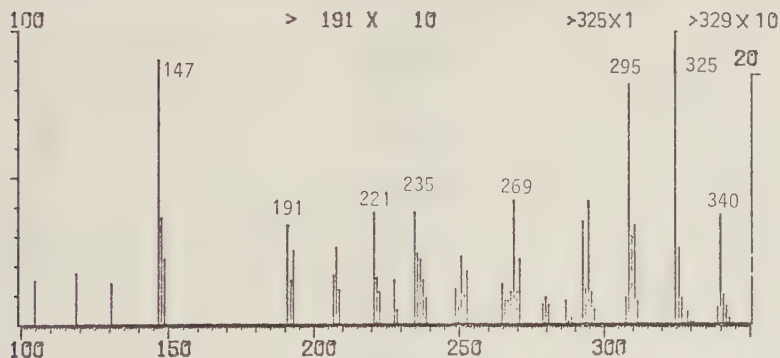


Abb. 10: *Platismatia glauca* (Extrakt I4, silyliert) 22°C



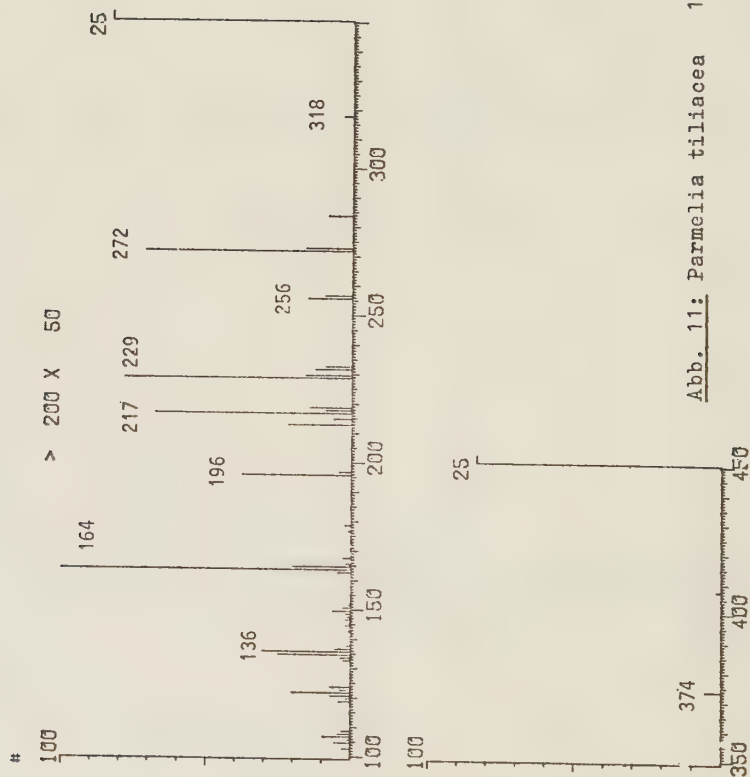


Abb. 11: *Parmelia tiliacea* 100°C

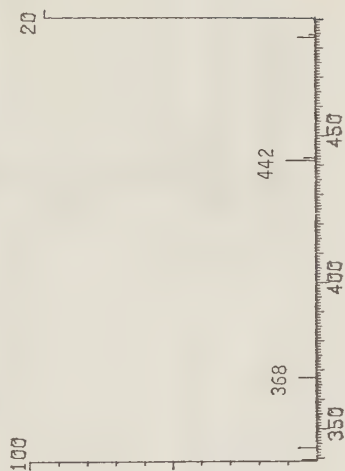
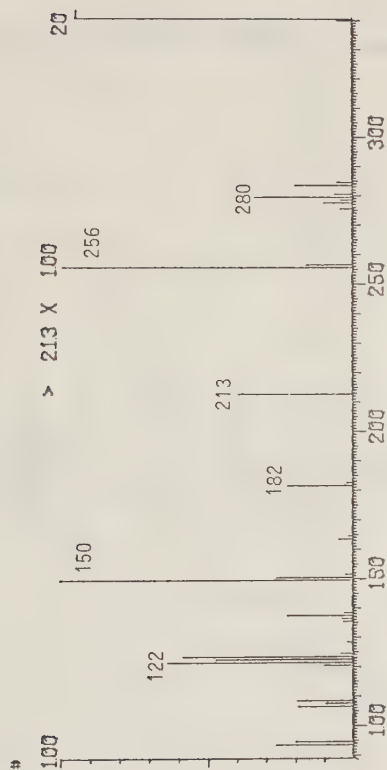


Abb. 12: *Peltigera horizontalis*
147°C

CLADONIA FURCATA 235 °C

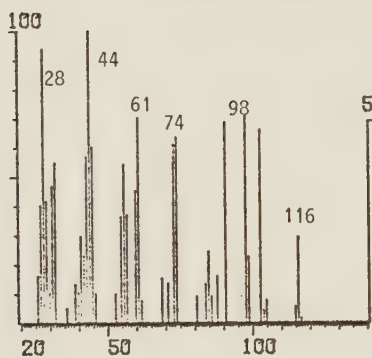
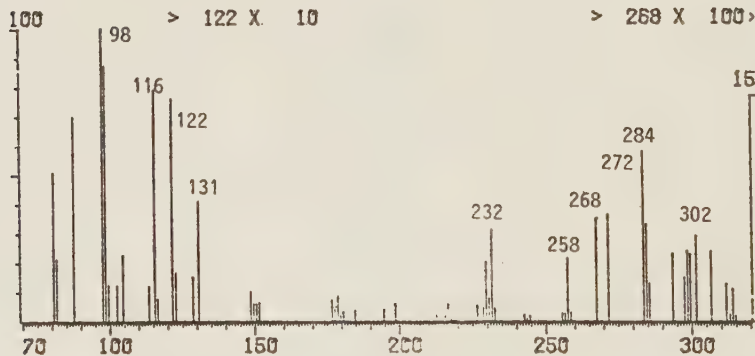


Abb. 13: *Cladonia furcata*

> 122 X 10 > 268 X 100 > 312 X 10



100 > 326 X 100

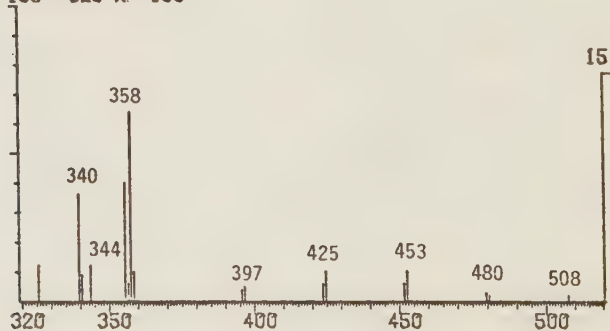


Abb. 14: *Cetraria islandica* (Extrakt II1) 190 °C

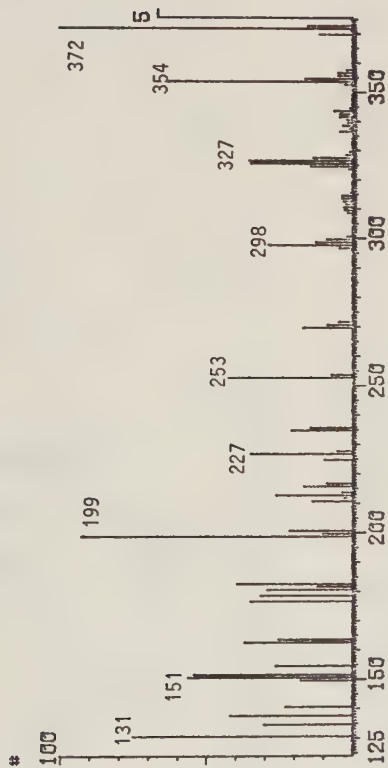
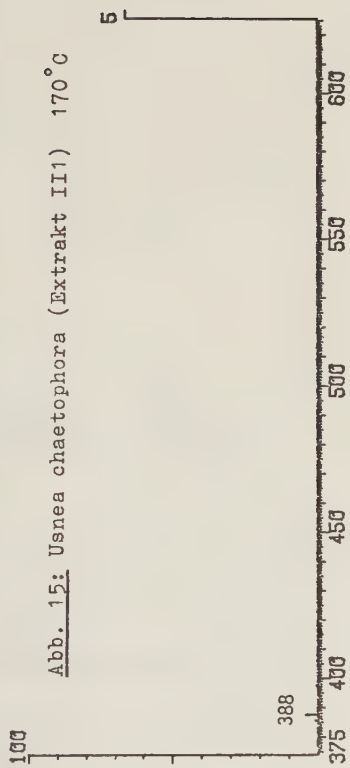


Abb. 15: *Usnea chaetophora* (Extrakt II) 170°C



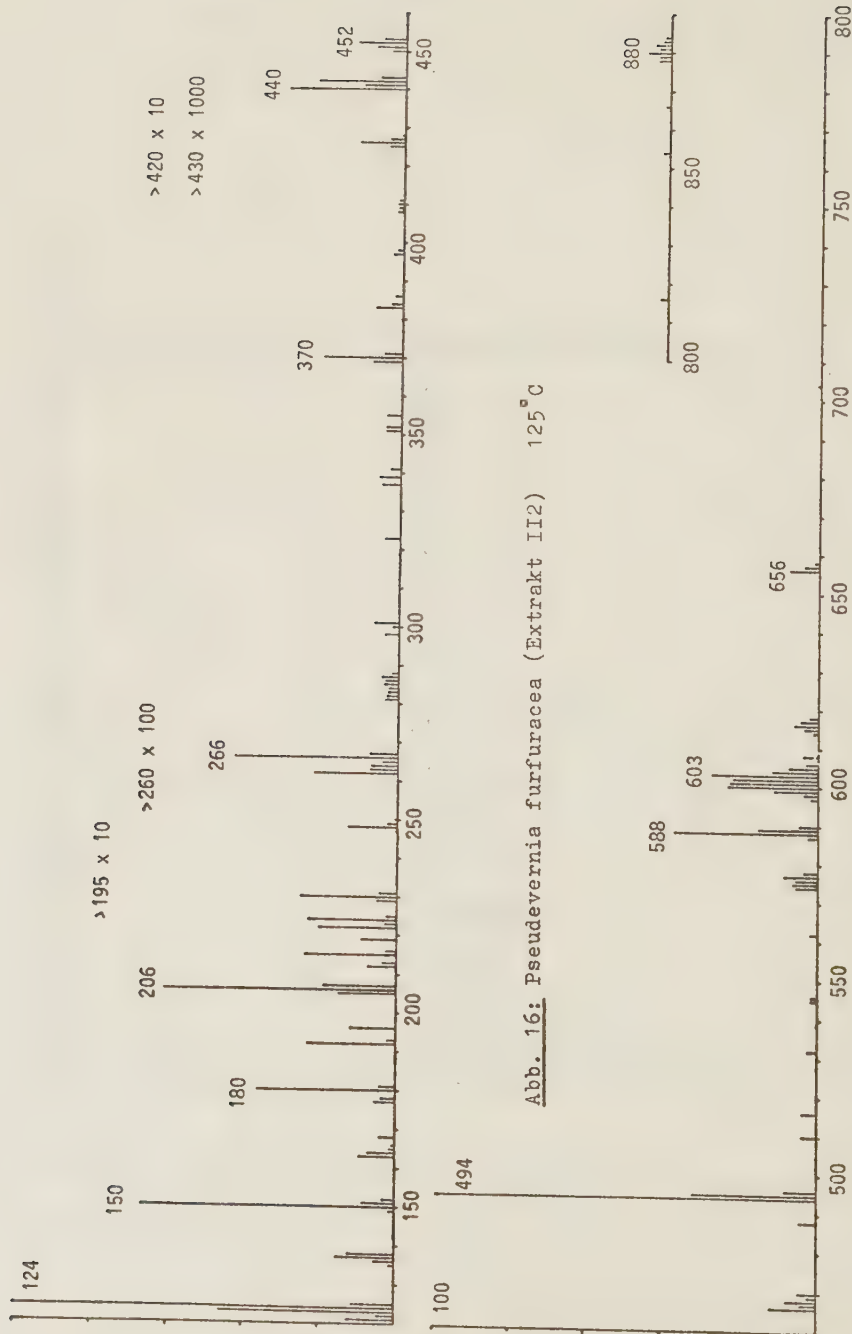
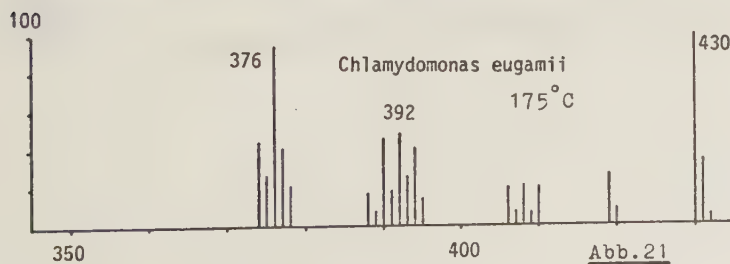
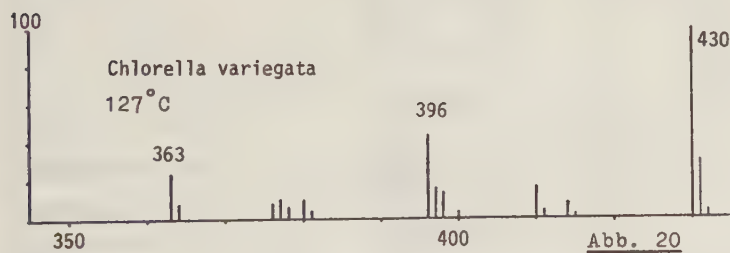
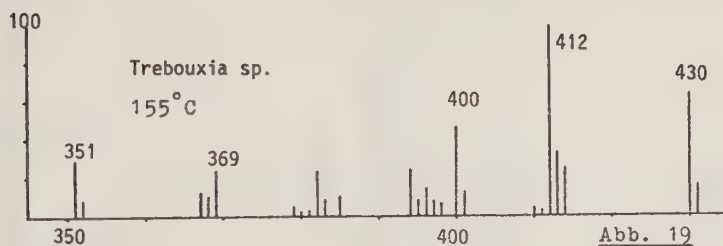
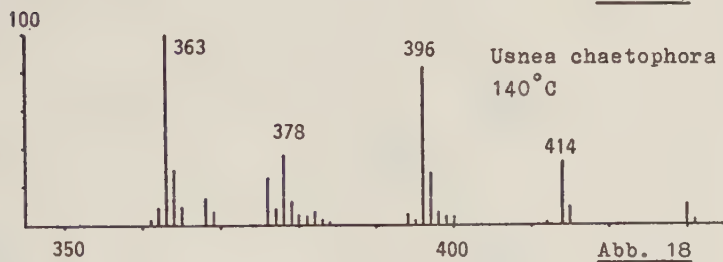
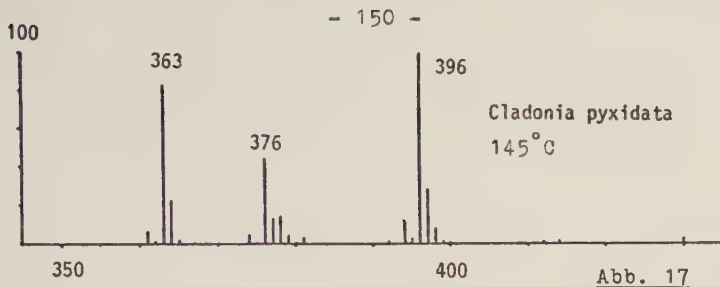
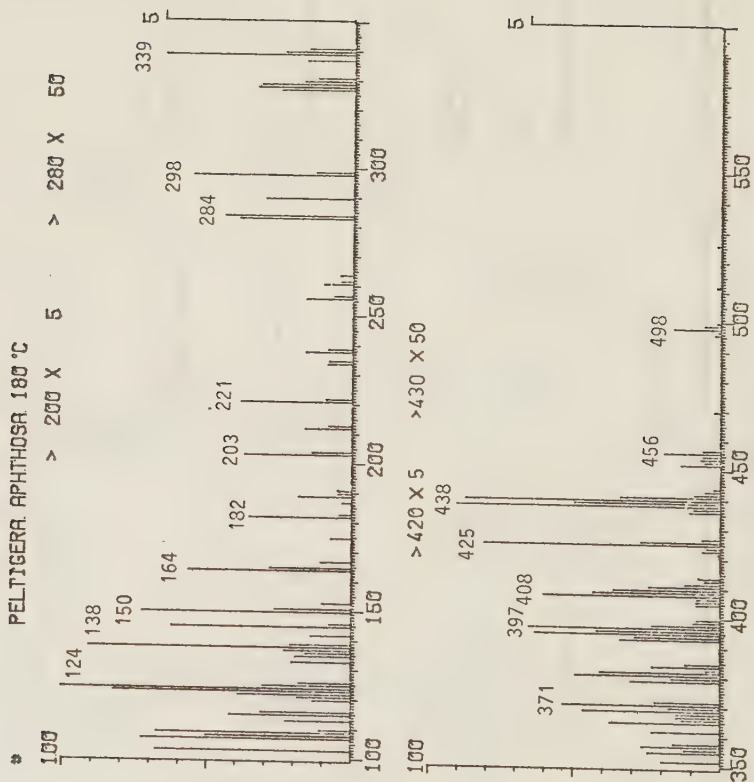


Abb. 16: *Pseudevernia furfuracea* (Extrakt II2) 125°C



PELTIGERA APHTHOSA 180 °C



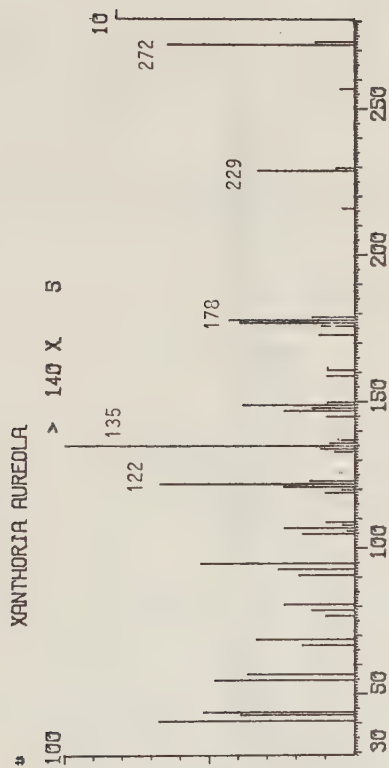


Abb. 23: *Xanthoria aureola* 20°C

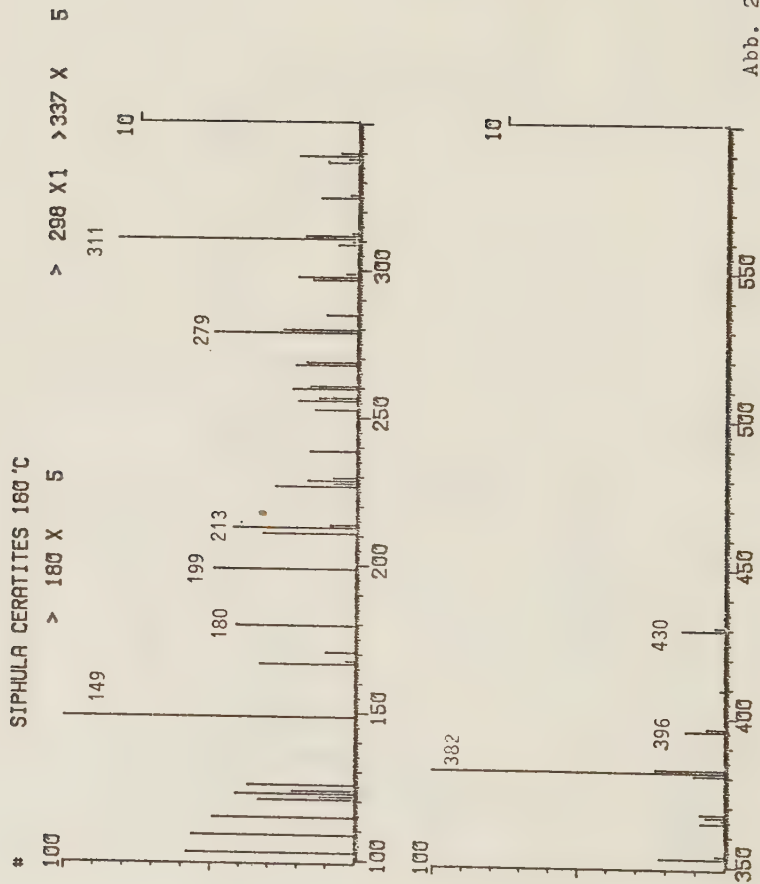


Abb. 24

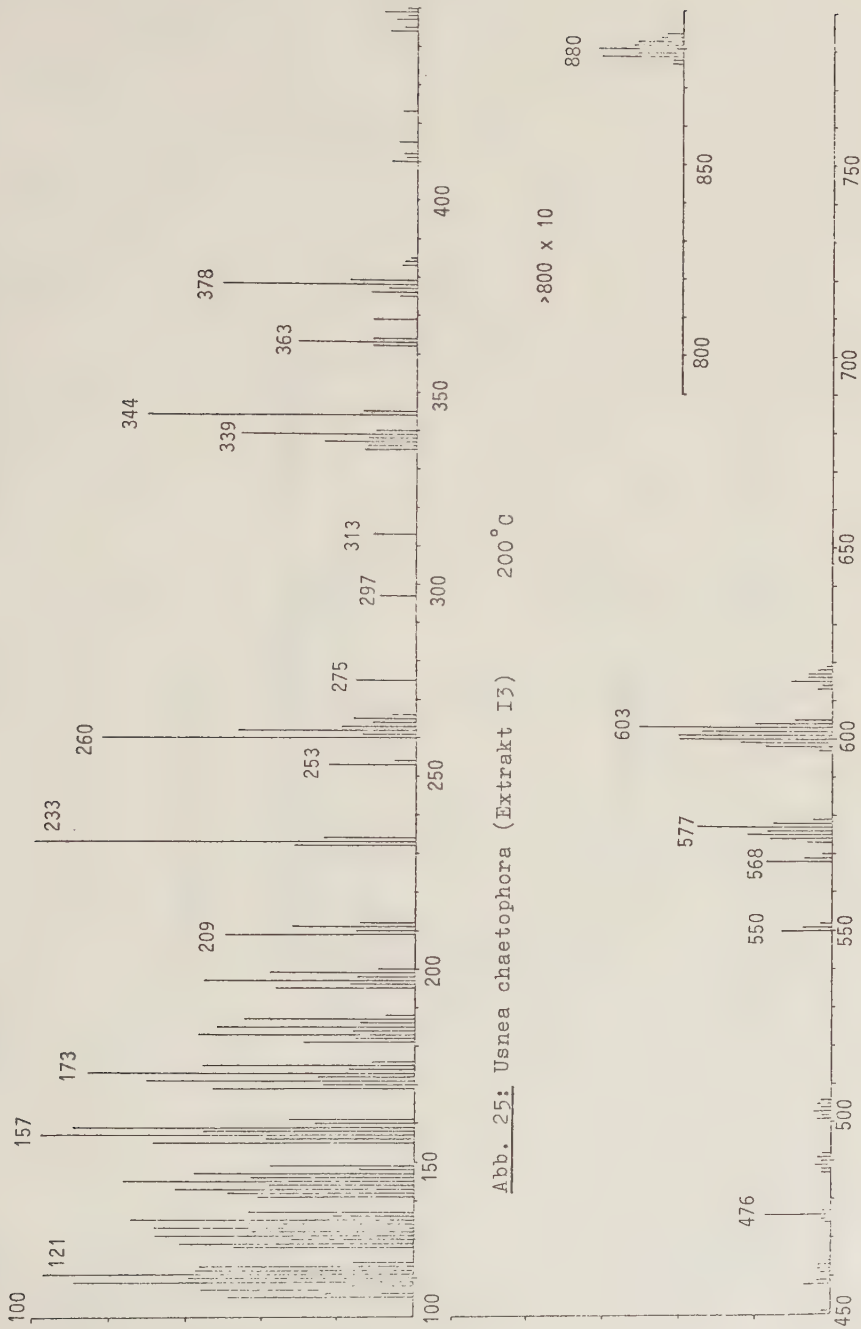


Abb. 25: *Usnea chaetophora* (Extrakt I3) 200°C

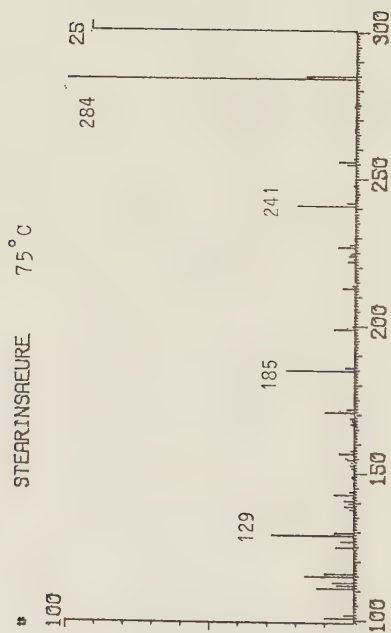
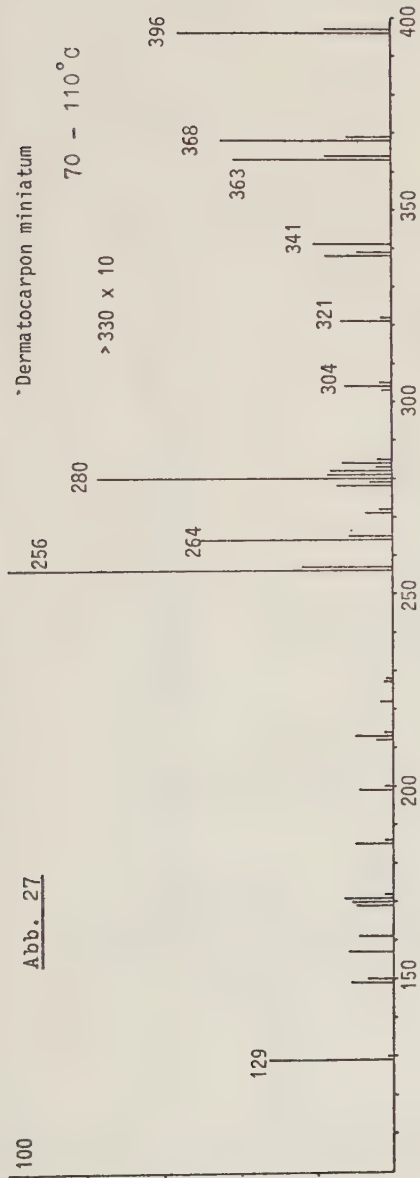


Abb. 26: Stearinsäure

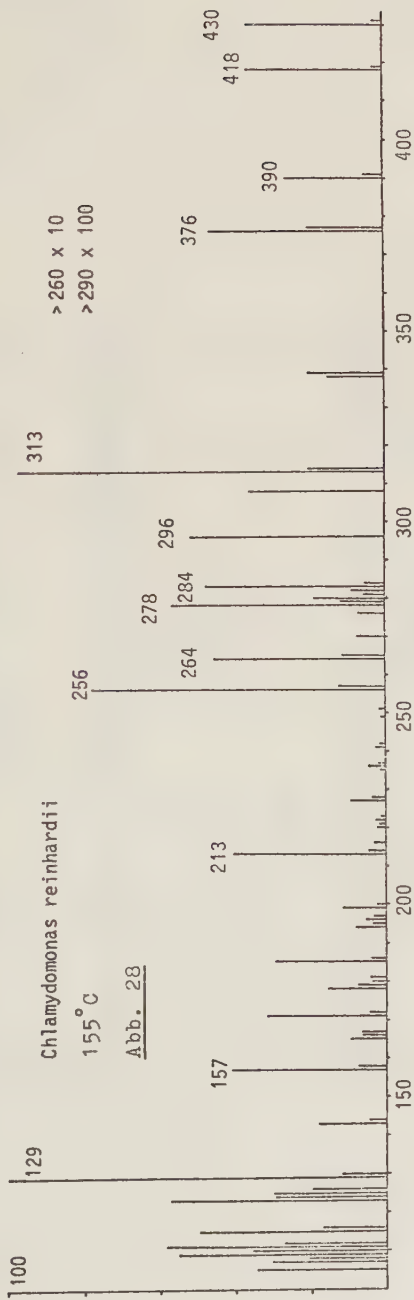
Abb. 27



- 156 -

Chlamydomonas reinhardtii
155°C

Abb. 28



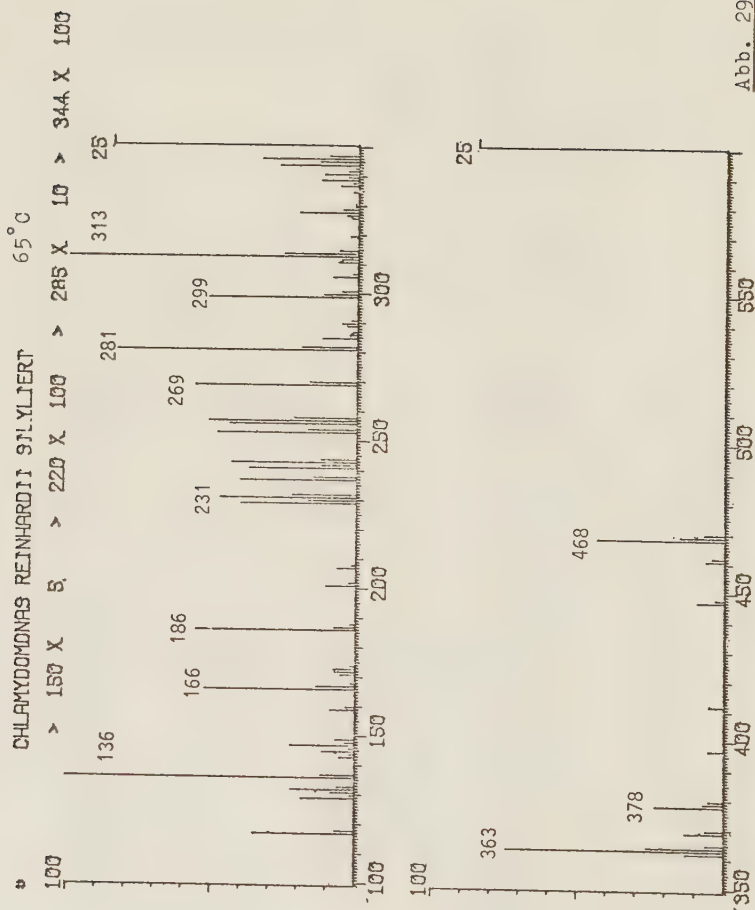


Abb. 29

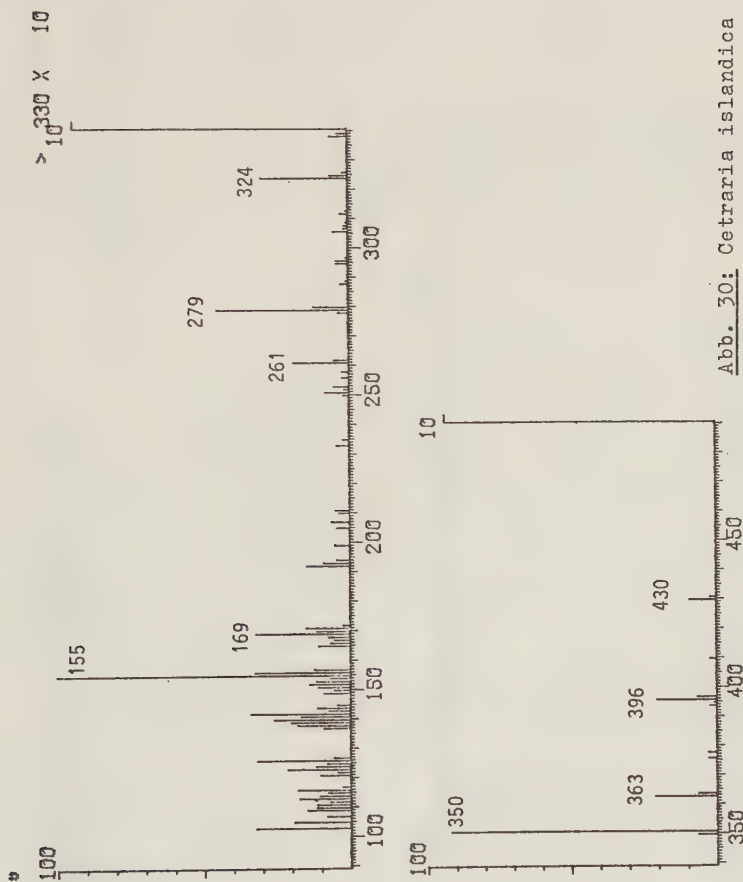


Abb. 30: *Cetraria islandica* 135°C

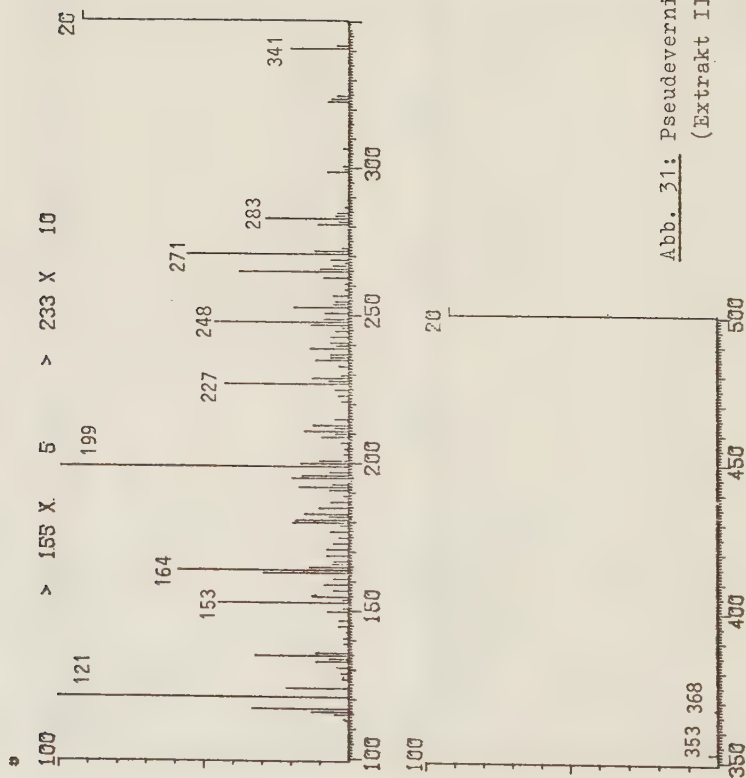


Abb. 31: *Pseudevernia furfuracea*
(Extrakt II1) 155°C

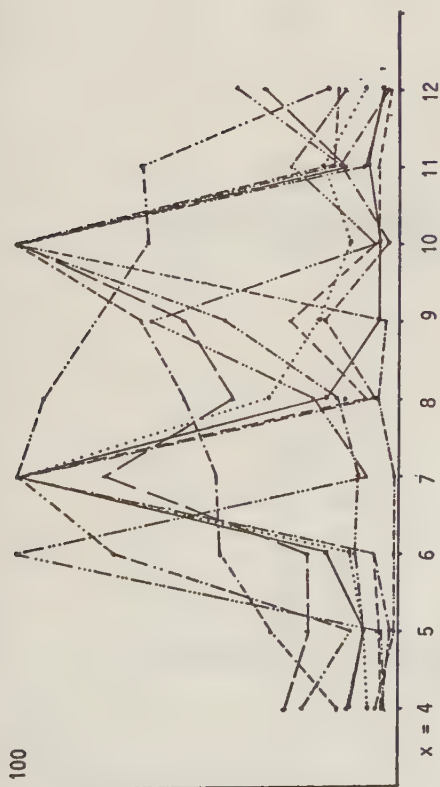


Abb. 32

I
II
II - ROH
III
III - ROH
III - 2 ROH
IV
IV - ROH
IV - 2 ROH
IV - 3 ROH

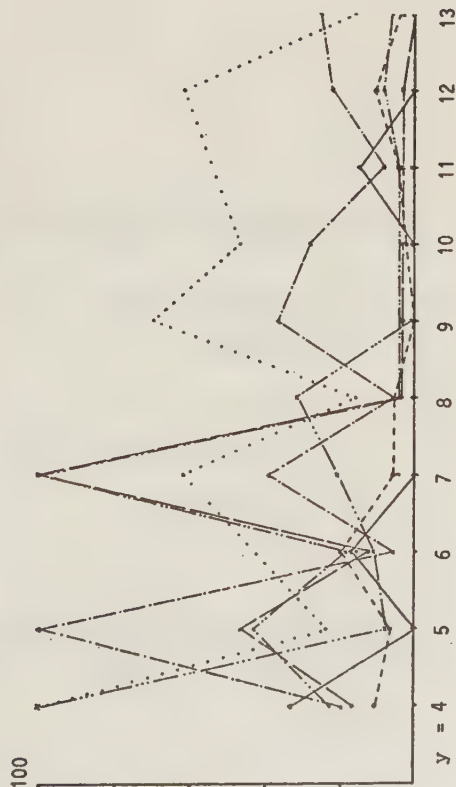


Abb. 33

X - 2 ROH
X - 3 ROH
XI - ROH
XI - 2 ROH
XII
XII - ROH
XIII

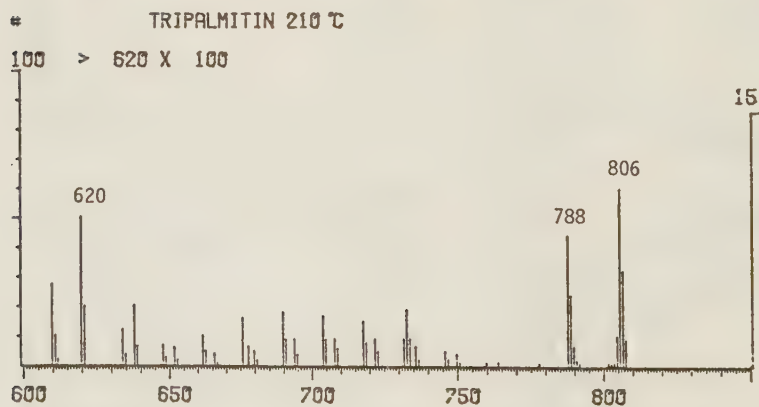
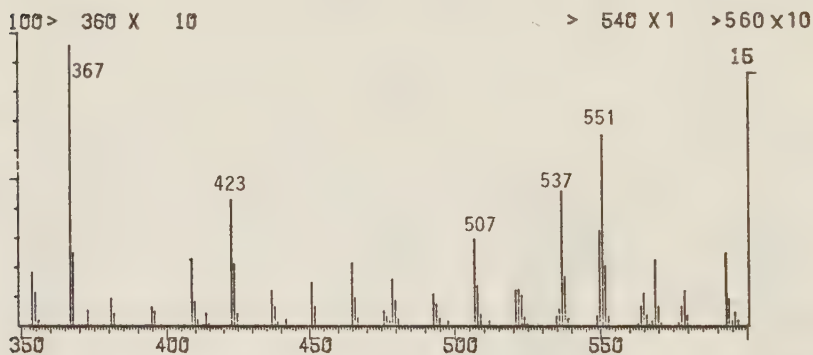
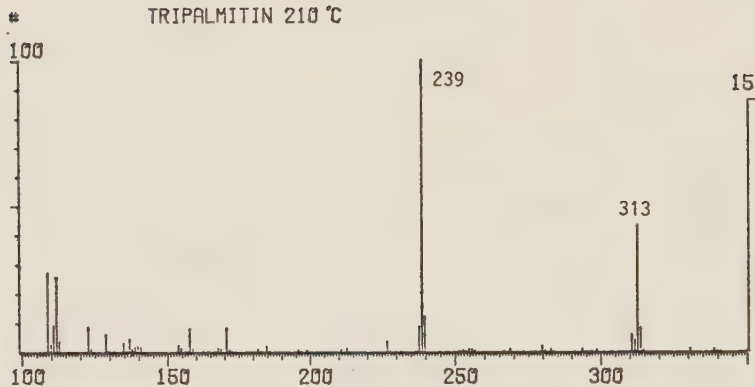


Abb. 34

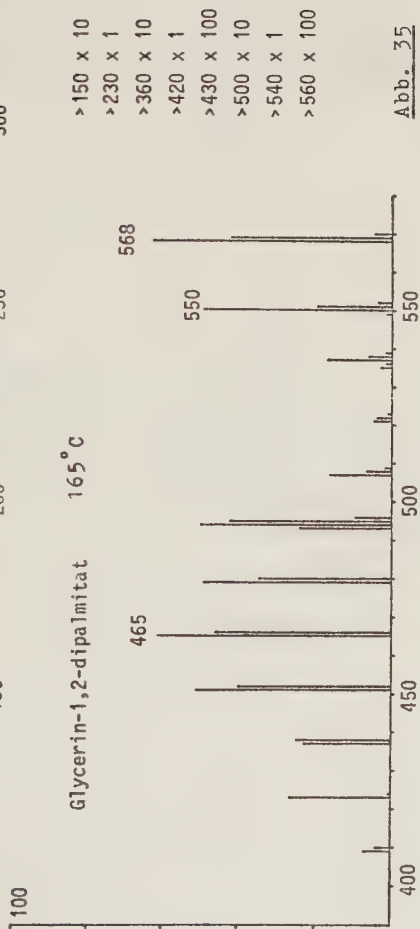


Abb. 35

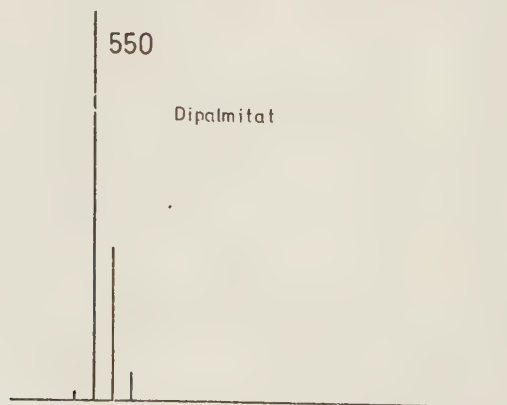
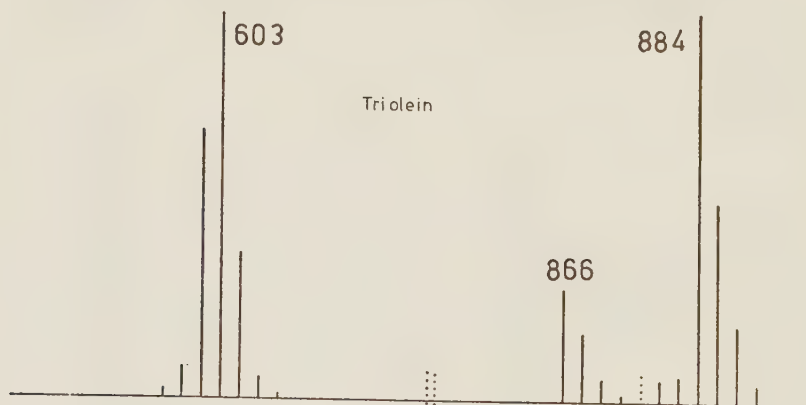
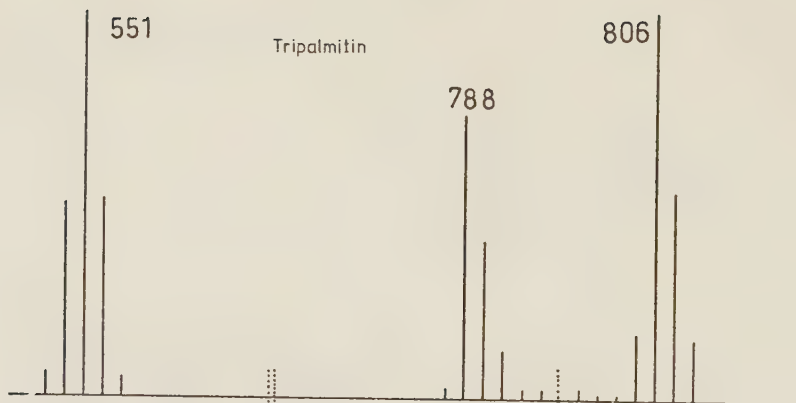


Abb. 36

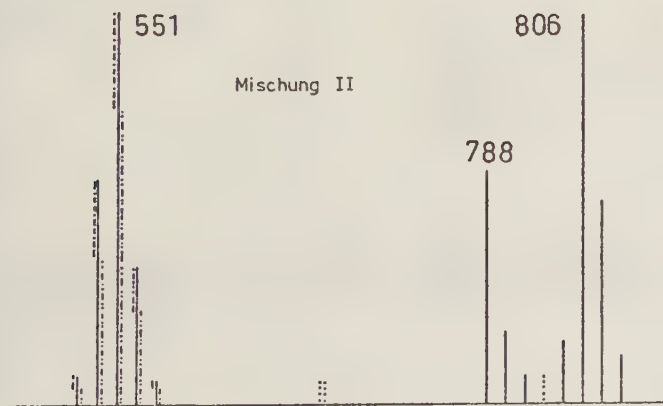
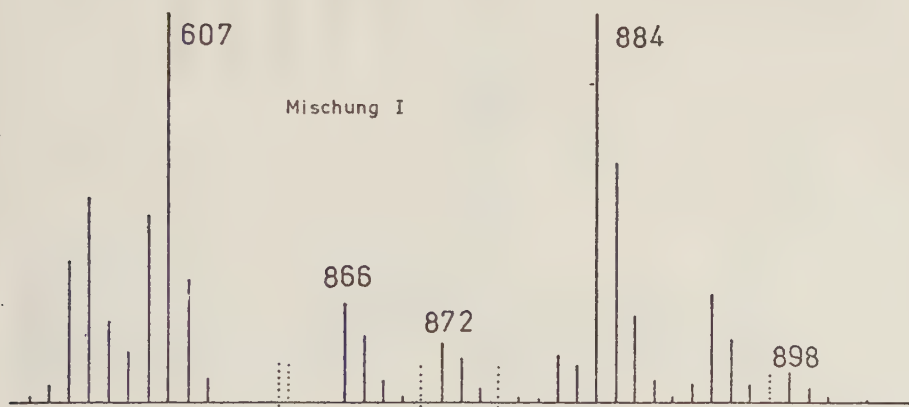
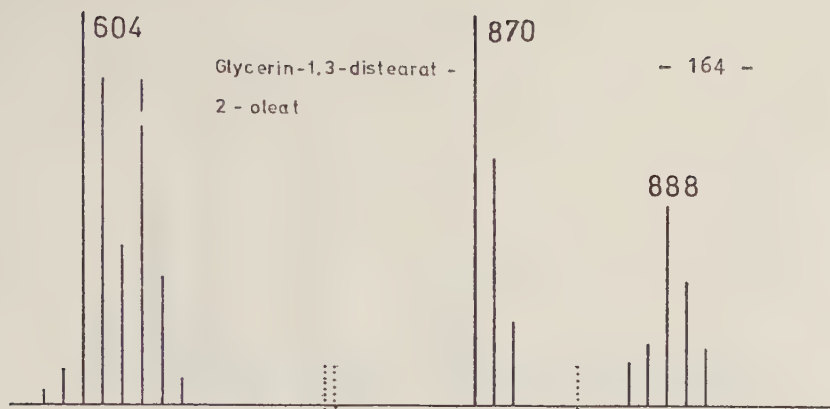


Abb. 36

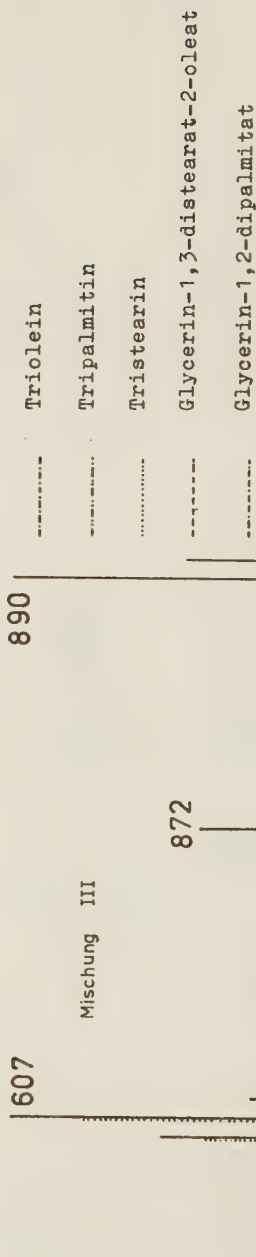
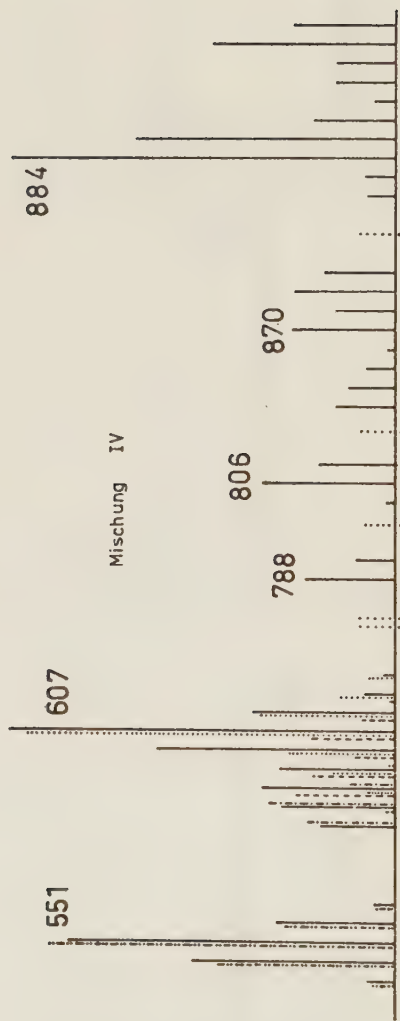


Abb. 36

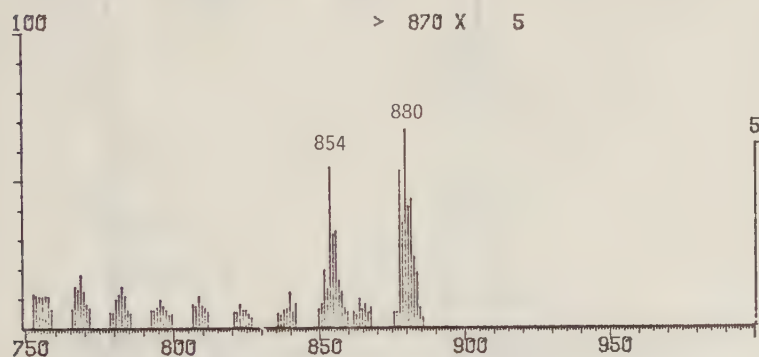
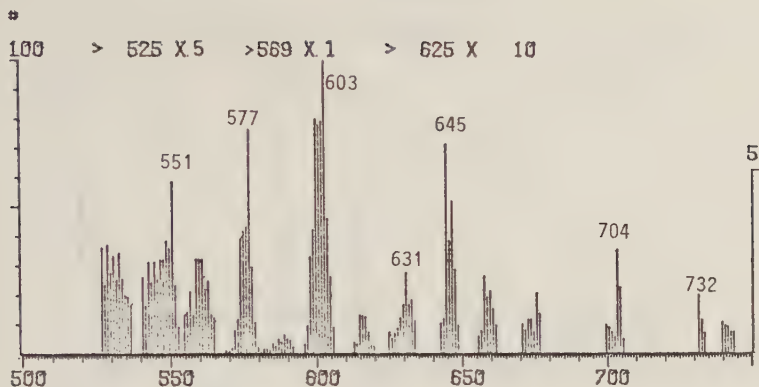


Abb. 37: *Usnea chaetophora* 200°C

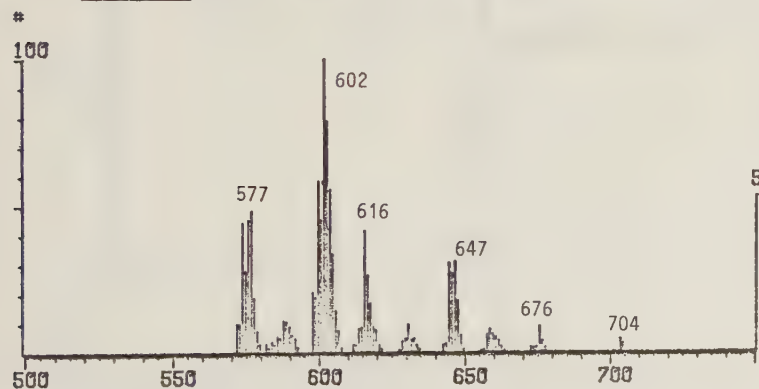


Abb. 38: *Parmelia taractica* 200°C

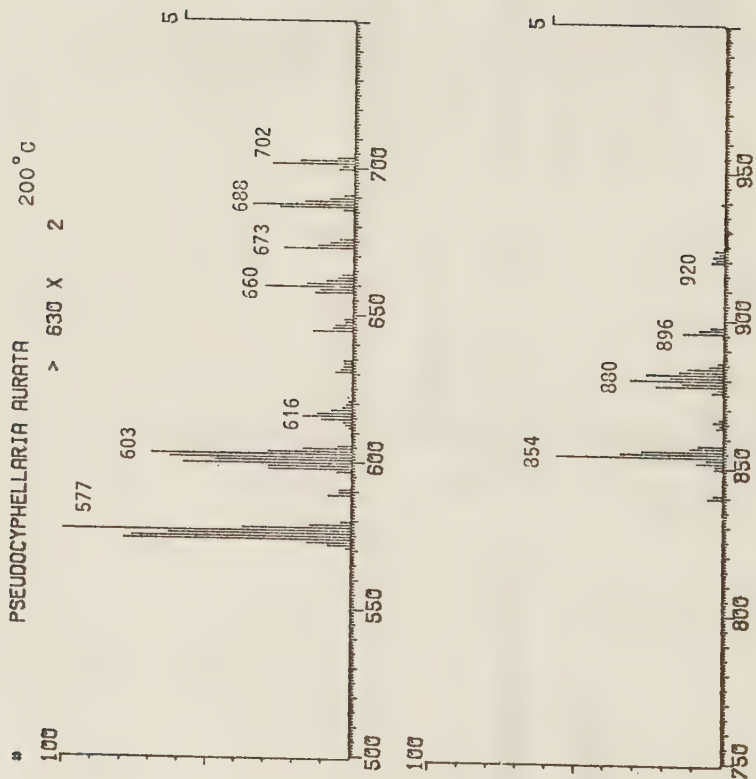


Abb. 39

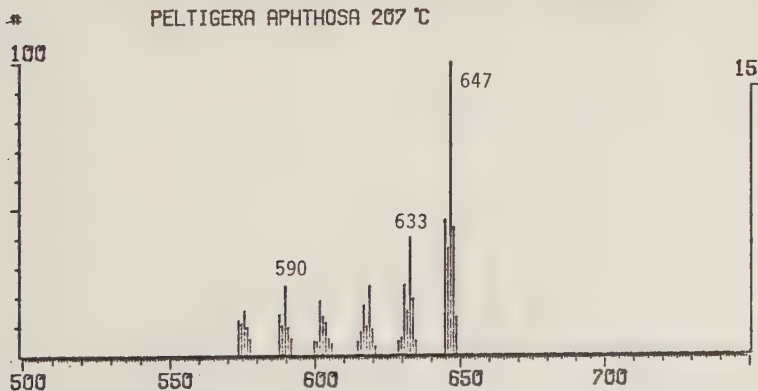
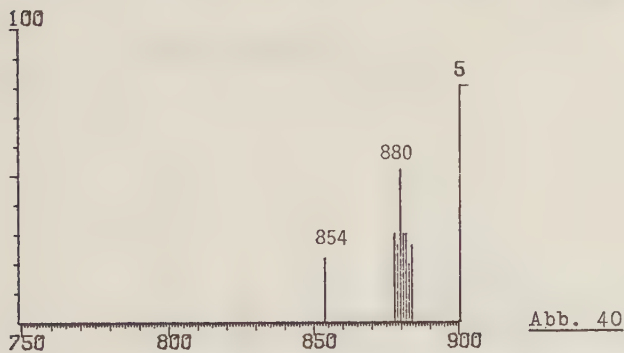
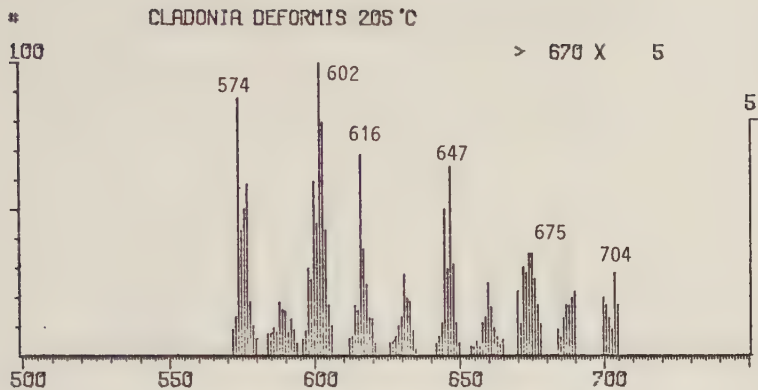


Abb. 41

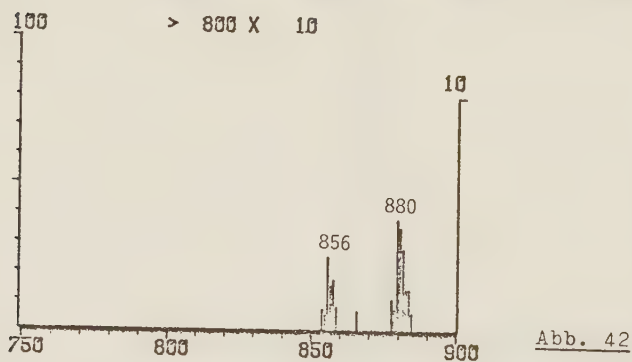
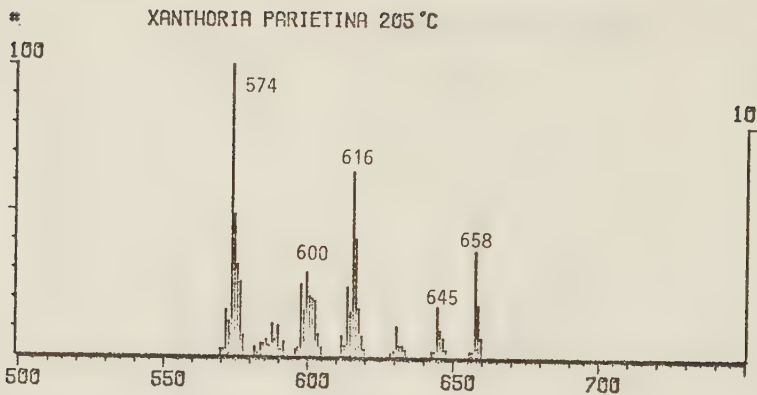


Abb. 42

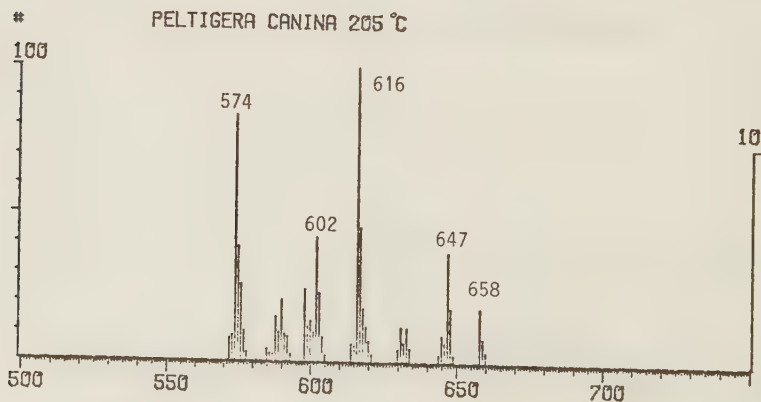
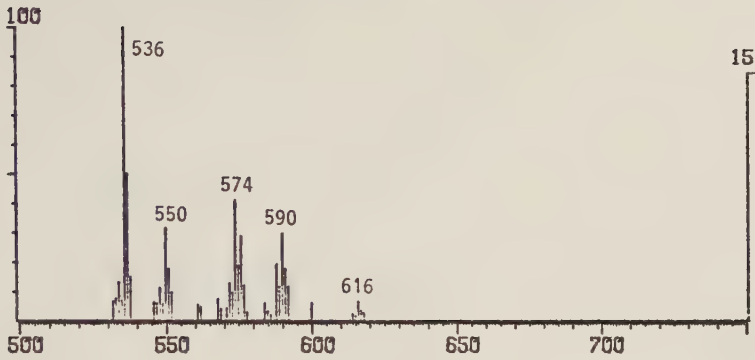


Abb. 43

*

NOSTOC COMMUNE 150 C

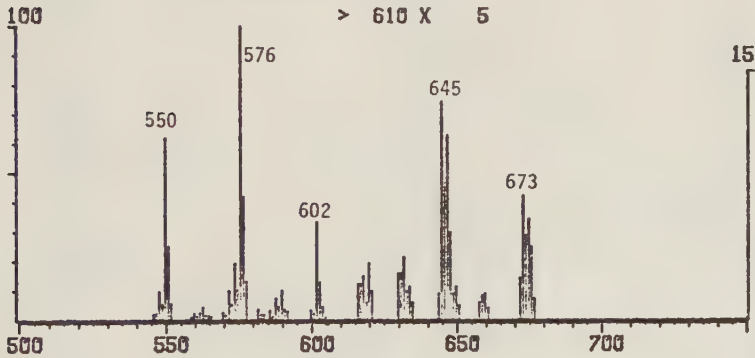
Abb. 44



*

CHLAMYDOMONAS EUGAMII 195 C

> 610 X 5



100

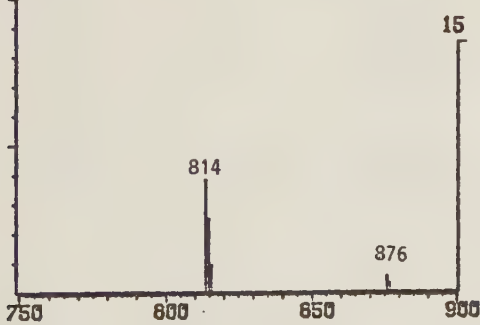


Abb. 45

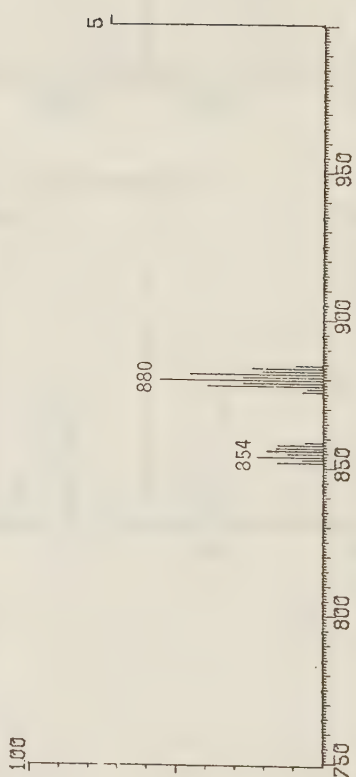


Abb. 46:
Cetraria islandica

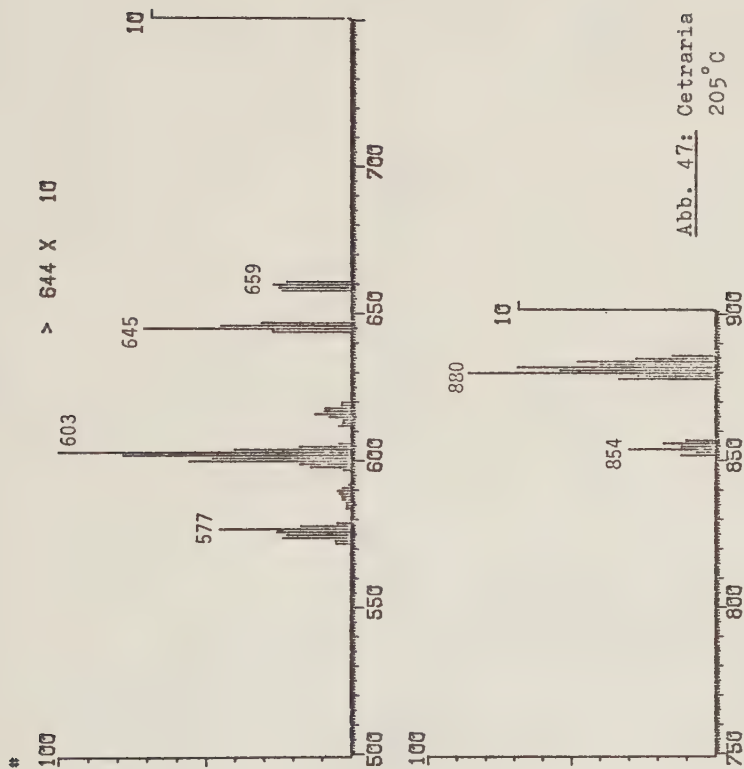
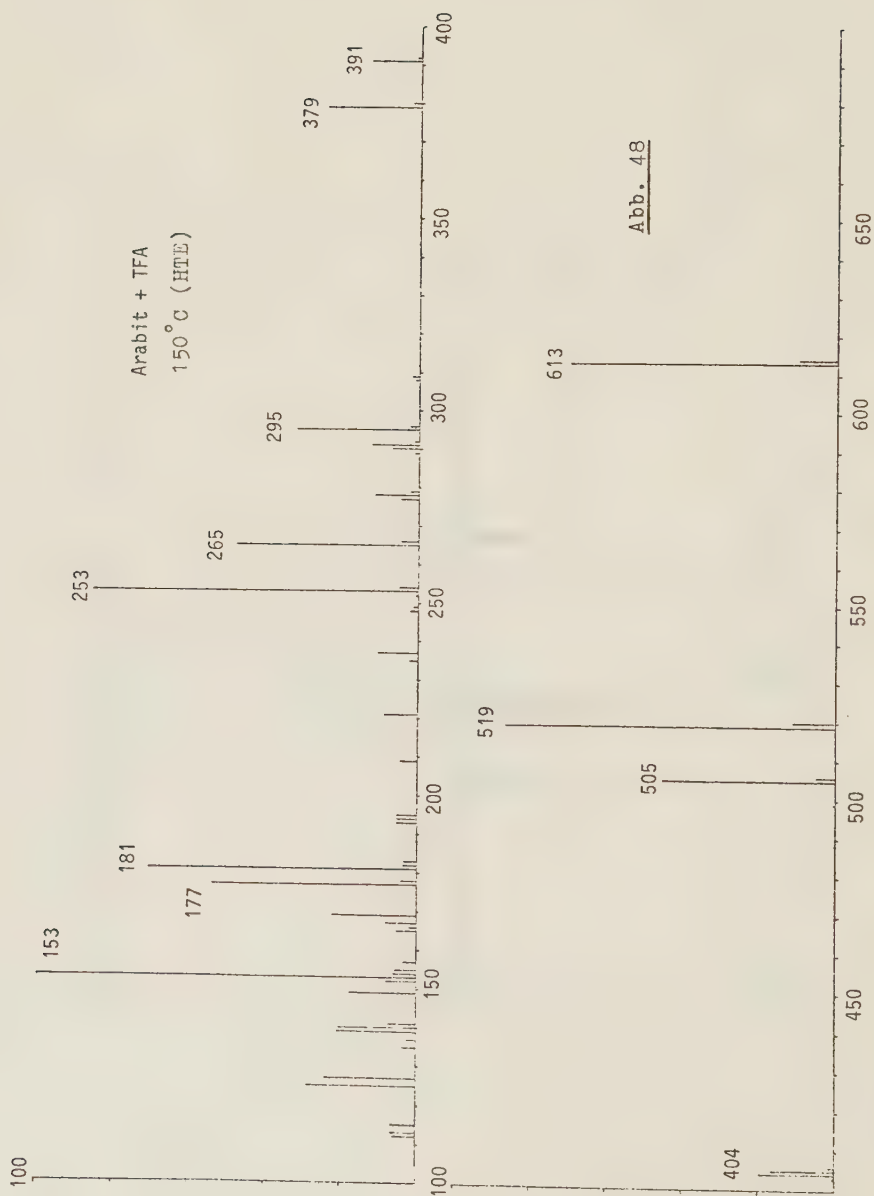
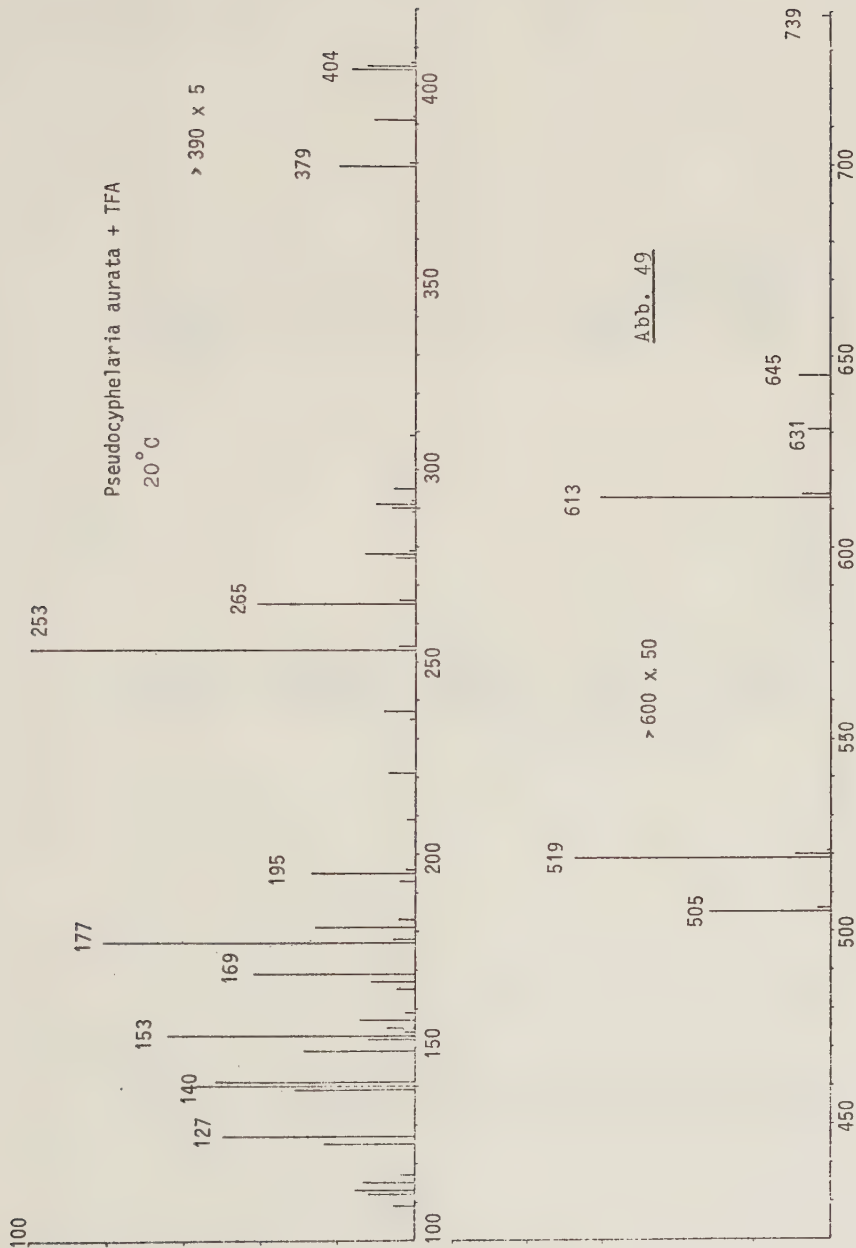


Abb. 47: *Cetraria islandica*
205°C





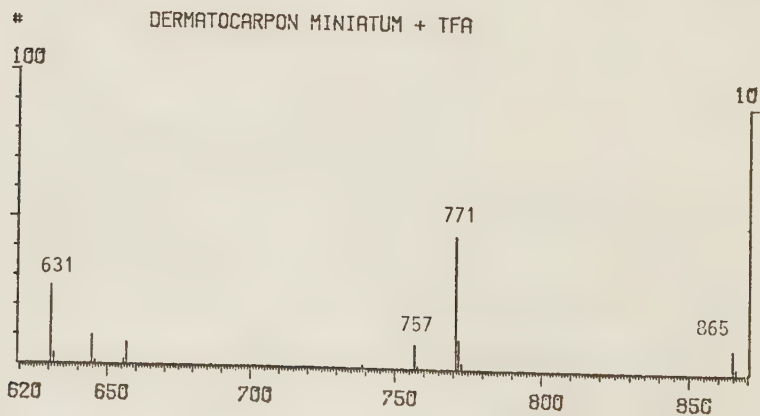
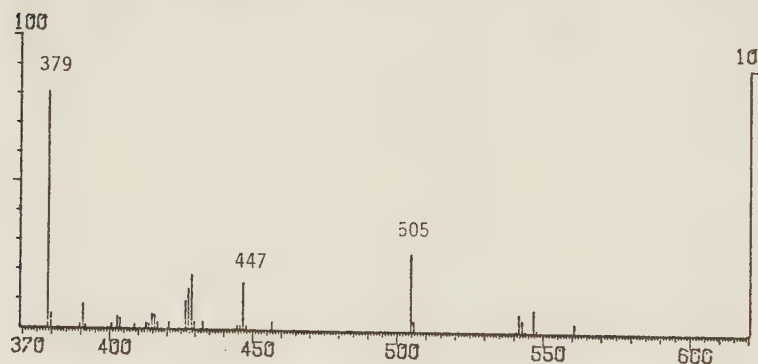
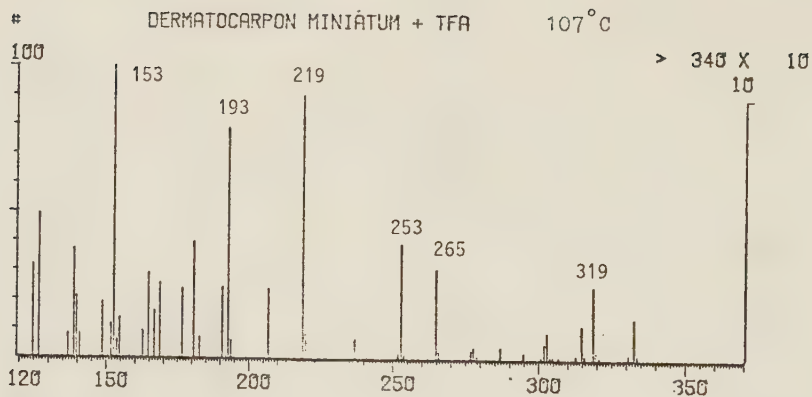


Abb. 50

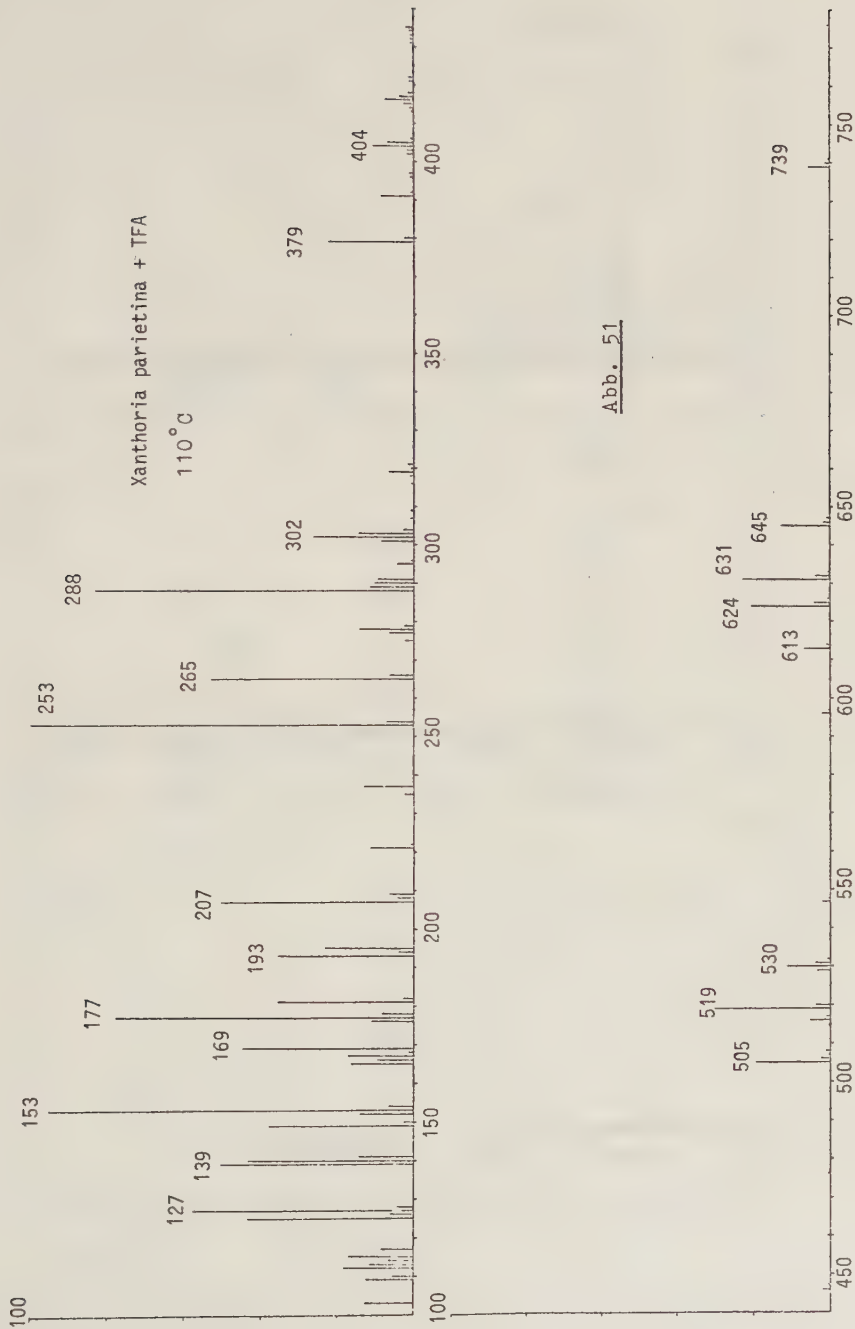
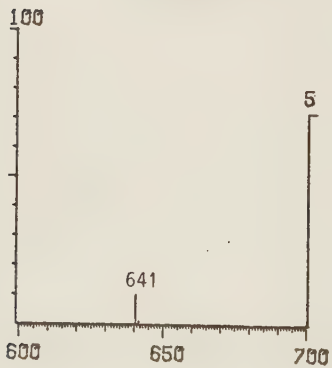
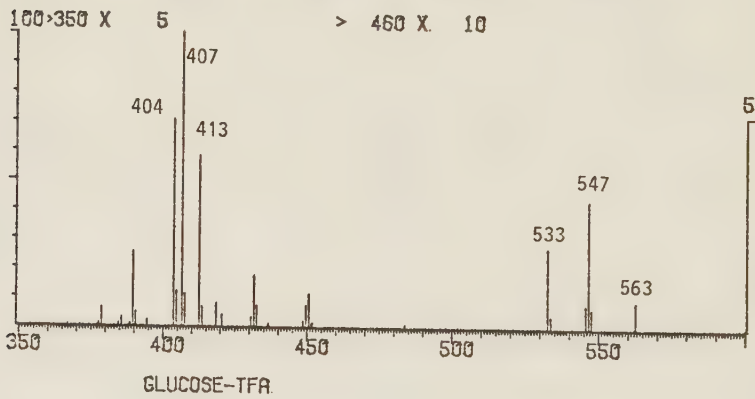
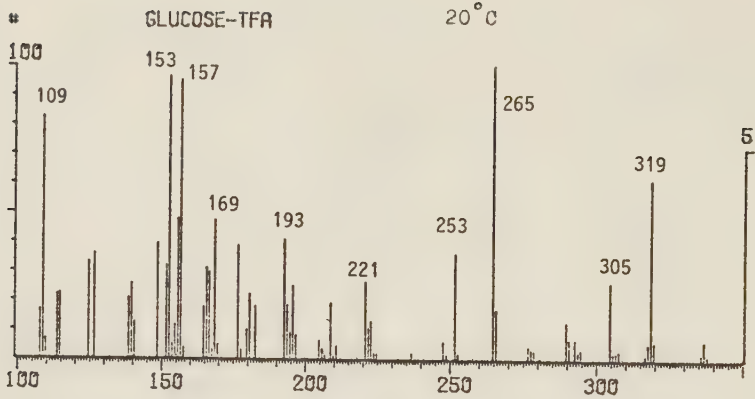


Abb. 51



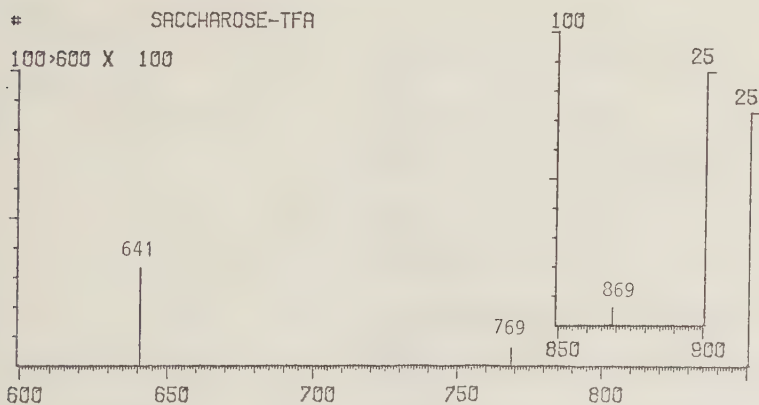
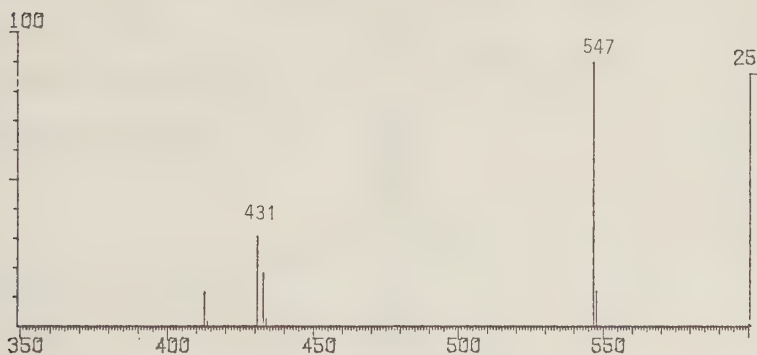
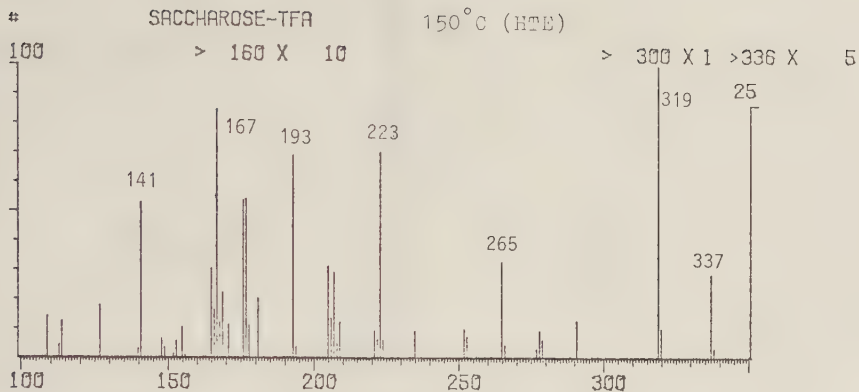
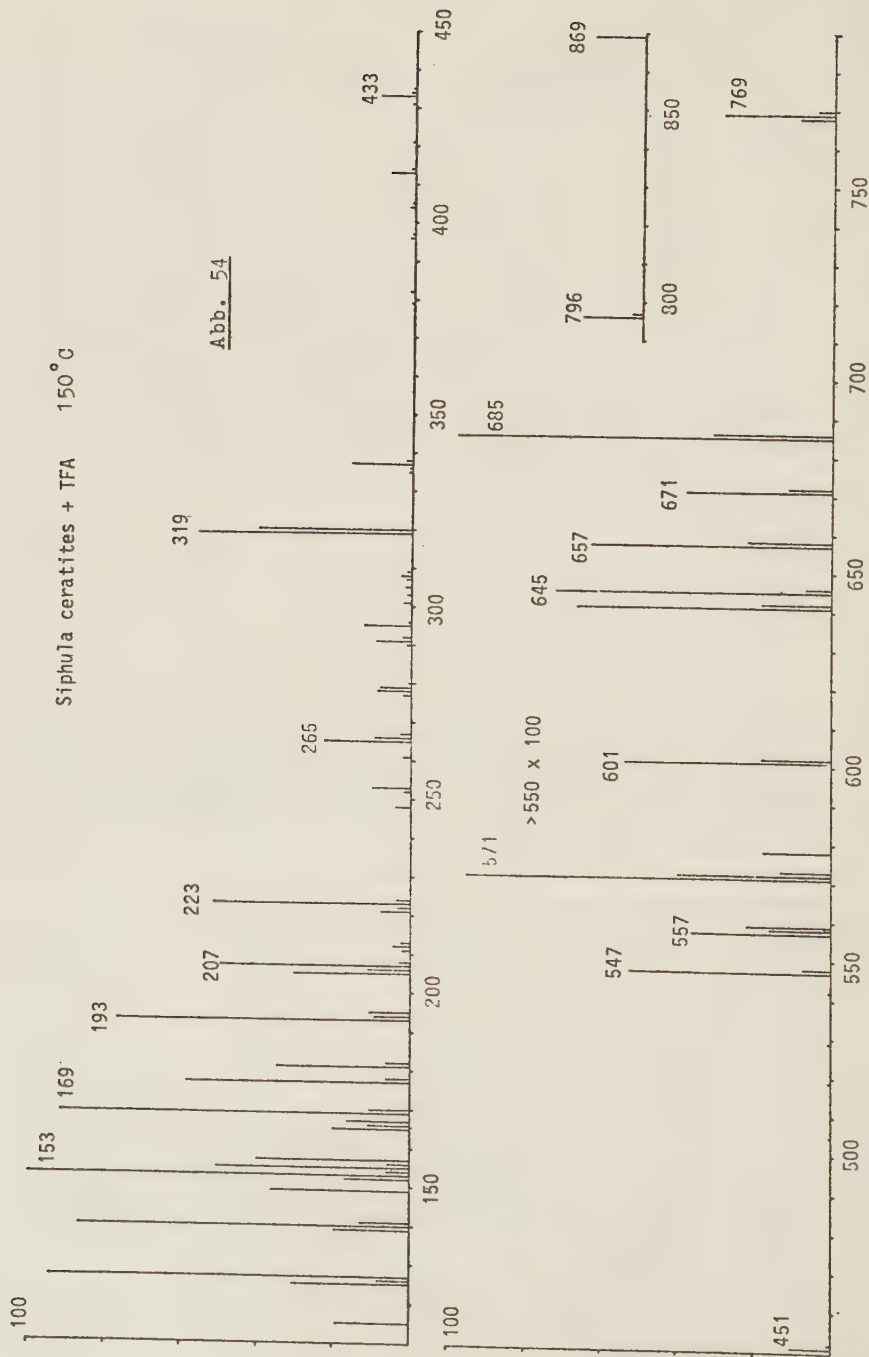


Abb. 53

Siphula ceratites + TFA 150 °C

Abb. 54



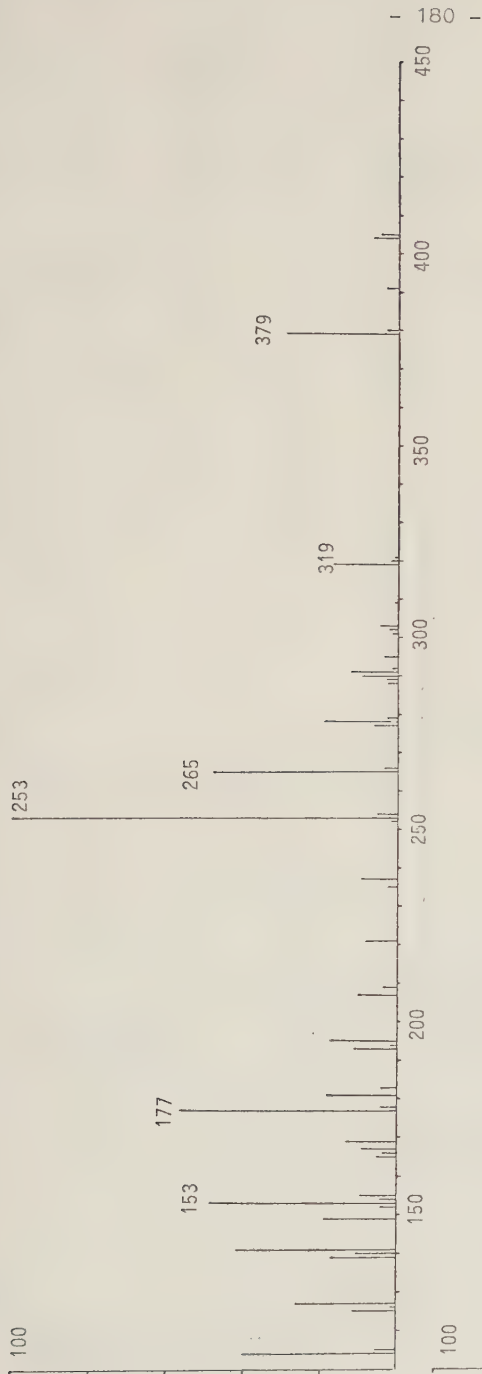
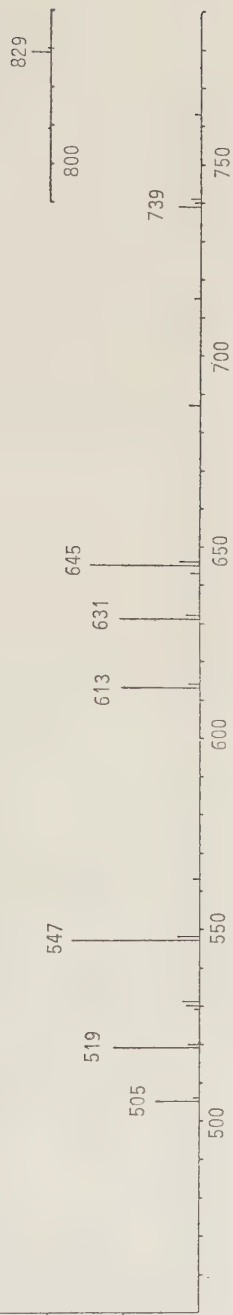


Abb. 55

Umbilicaria pustulata + TFA 57 °C

$\times 10$



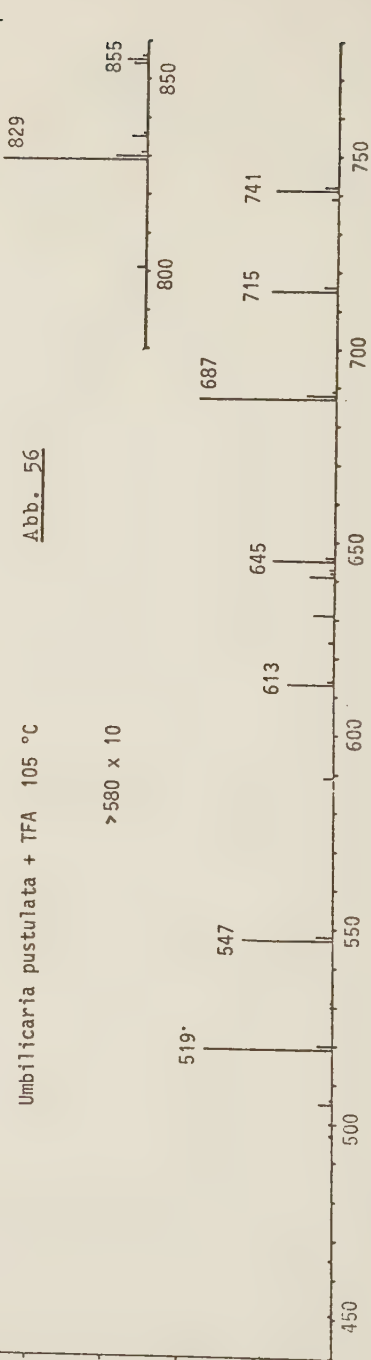
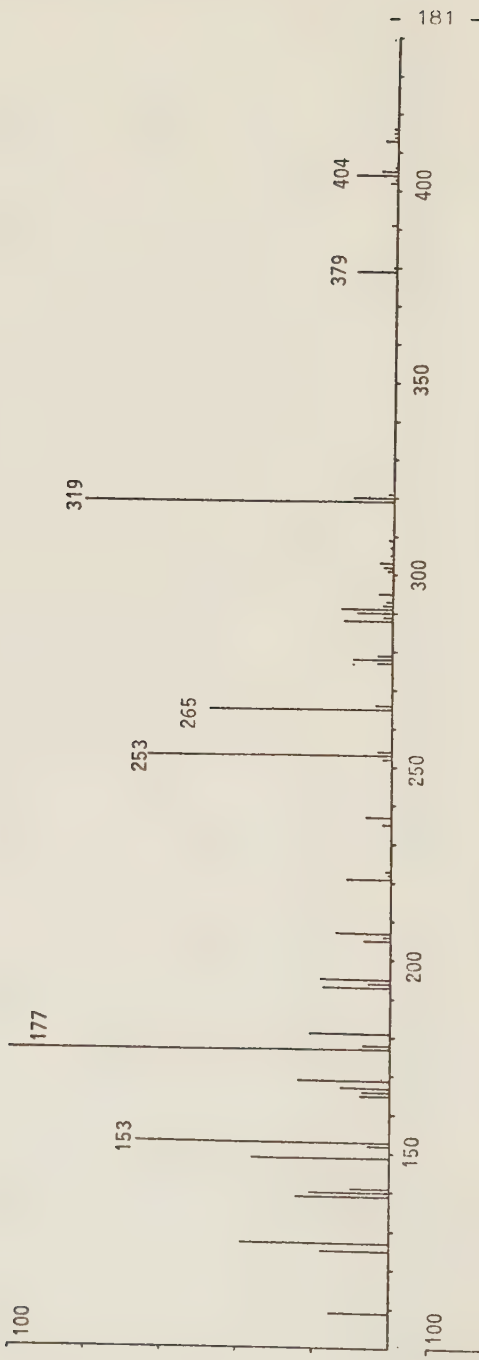


Abb. 56

>580 x 10



Abb. 57

Umbilicaria pustulata + TFA 155 °C

> 430 x 10 > 510 x 1 > 550 x 10

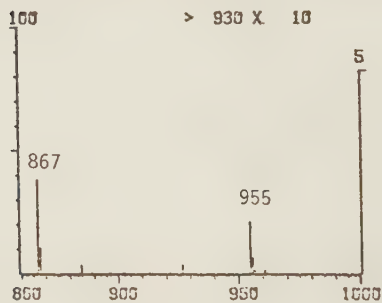
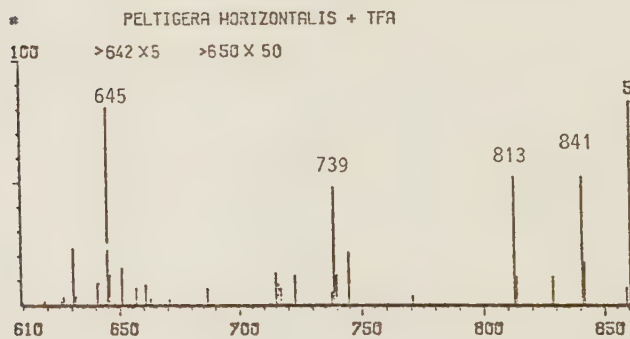
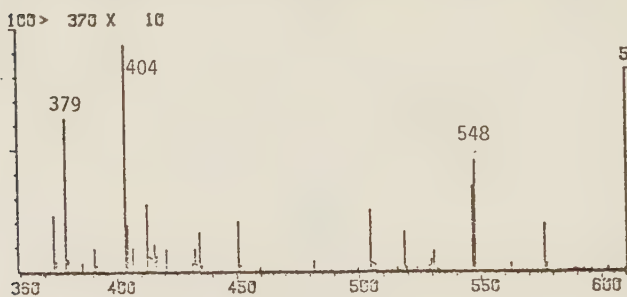
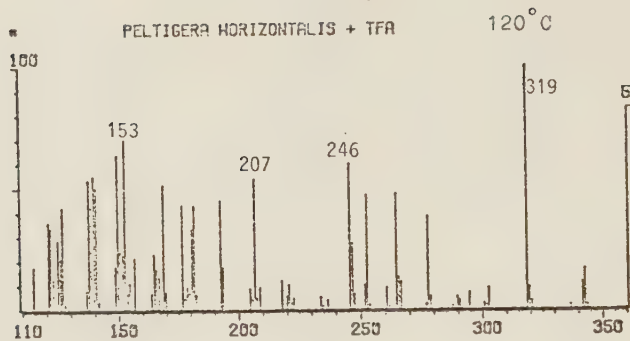
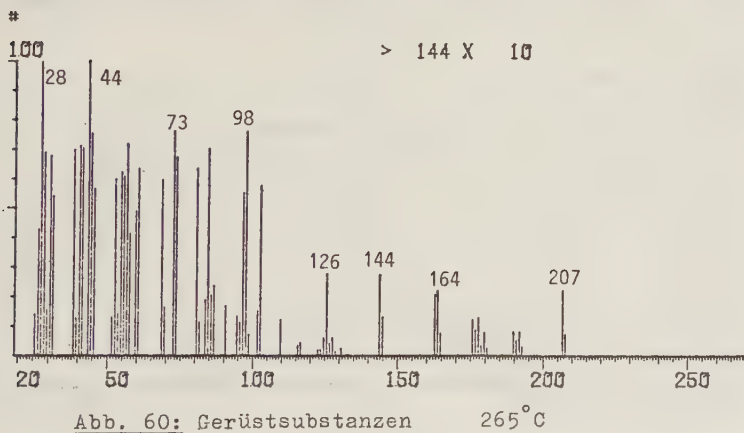
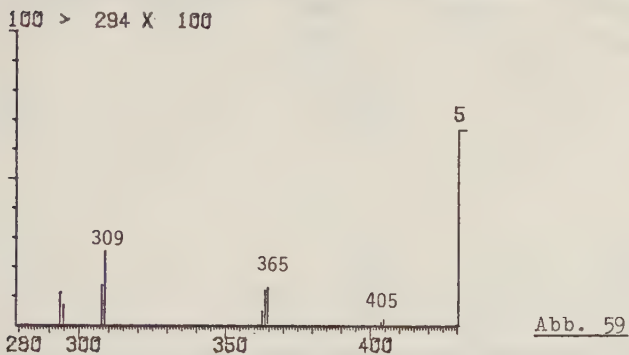
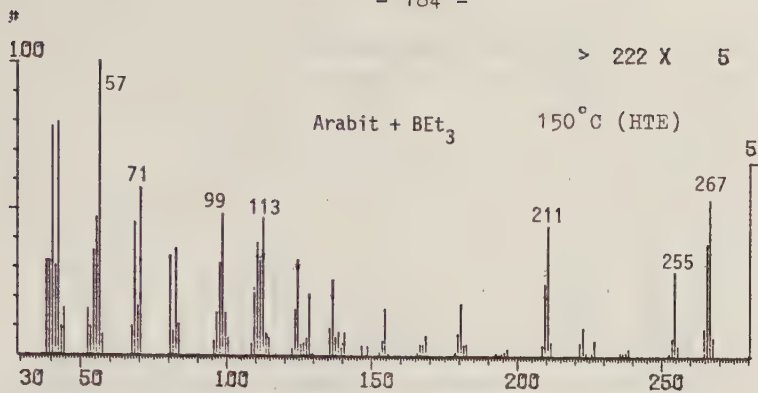
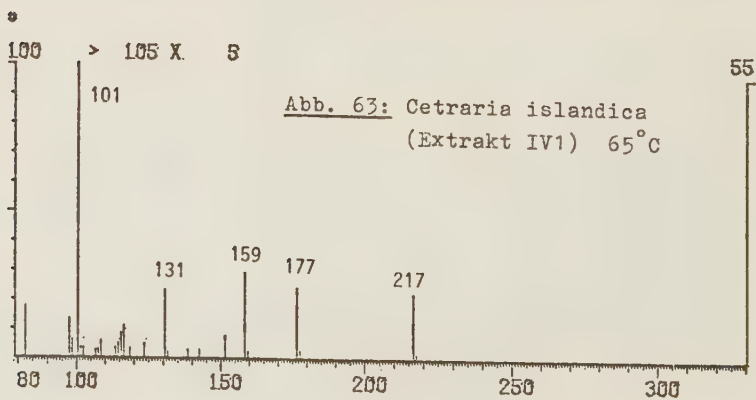
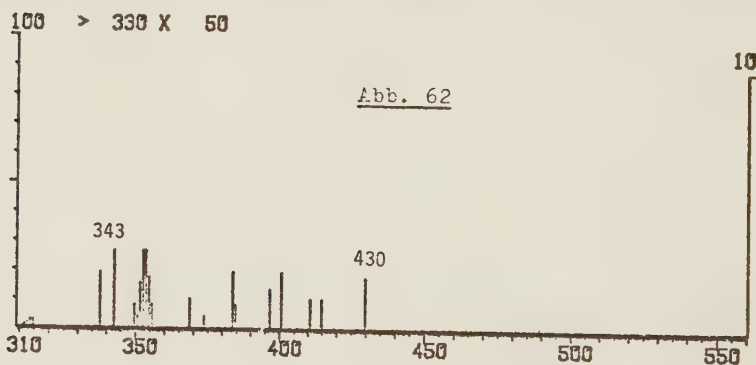
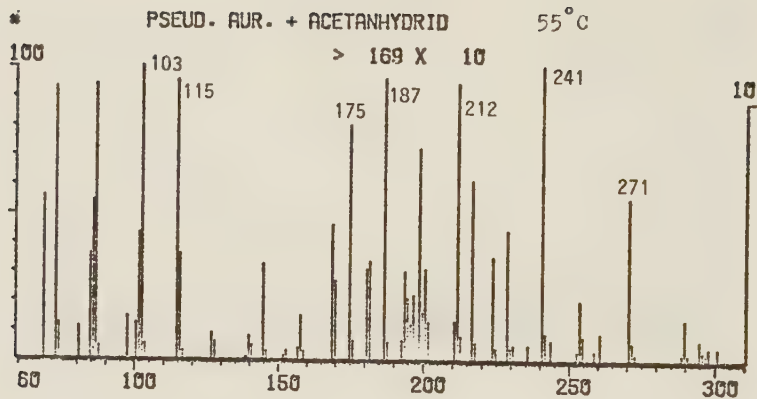


Abb. 58





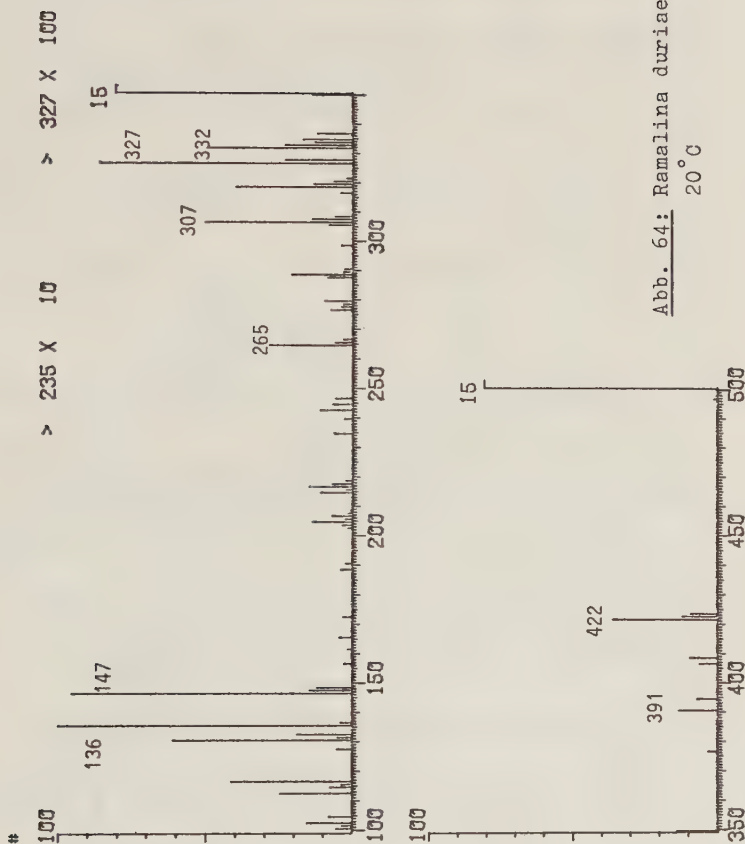


Abb. 64: *Ramalina duriaeri* (silyliert)
20 °C

D. LITERATURVERZEICHNIS

- 1) S. Huneck, in: Progress in Phytochemistry, L. Reinhold u. Y. Liwschitz (Herausg.), Bd. I, S. 223, Interscience Publ., London - New York - Sydney 1968
- 2) C. H. Fox, Dissertation Worcester Clark University 1968
- 3) K. Mosbach, Angew. Chem. 81, 233 (1969).
- 4) C. F. Culberson, Chemical and Botanical Guide to Lichen Products, Chapel Hill, University of North Carolina Press 1969
- 5) W. Nylander, Flora (Jena) 49, 198 (1866).
- 6) M. E. Hale, jr., The Biology of Lichens, Edward Arnold Ltd., London 1967
- 7) J. Santesson, Acta Chem. Scand. 21, 1162 (1967).
- 8) Y. Asahina, J. Jap. Bot. 12, 516 (1936)
12, 859 (1936).
- 9) C. F. Culberson, Bryologist 73, 177 (1970).
- 10) C. J. Taylor, The Lichens of Ohio, Teil I, Ohio State University, Columbus, Ohio 1967
- 11) J. W. Thomson, The Lichen Genus Cladonia in North America, University of Toronto Press, Toronto 1967
- 12) J. L. Ramaut, R. Schuhmacker, J. Lambinon u. C. Baudin, Bull. Jard. Bot. Bruxelles 36, 399 (1966).
- 13) C. A. Wachtmeister, Acta Chem. Scand. 6, 818 (1952).
- 14) J. Santesson, Acta Chem. Scand. 21, 1162 (1967).
- 15) S. Huneck u. J. Linscheid, Z. Naturforsch. 23b, 717 (1968).
- 16) C. F. Culberson u. H. Kristinsson, J. Chromatogr. 46, 85 (1970)
- 17) N. Ikekawa, S. Natori, H. Ageta, K. Iwata u. M. Matsui, Chem. Pharm. Bull. 13, 320 (1965).
- 18) S. Shibata, T. Furuya u. Iizuka, Chem. Pharm. Bull. 13, 1254 (1965).
- 19) J. L. Bloomer, W. R. Eder u. W. F. Hoffman, Bryologist 73, 586 (1970).

- 20) loc. cit. 1)
- 21) J. Santesson, Arkiv Kemi 30, 479 (1969).
- 22) loc. cit. 15)
- 23) J. Santesson, Arkiv Kemi 30, 363 (1969).
- 24) J. Santesson, Arkiv Kemi 31, 57 (1969).
- 25) J. Santesson, Acta Univ. Upps., Abstr. Upps. Diss. Sci. 127, 1 (1969).
- 26) J. Santesson, Phytochemistry 9, 2149 (1970).
- 27) V. Ahmadjian u. M. E. Hale, The Lichens, Academic Press, New York - London 1973
- 28) M. L. Vorbeck, L. R. Mattick, F. A. Lee u. C. S. Pederson, Anal. Chem. 33, 1512 (1961).
- 29) W. Caruthers u. R. A. W. Johnstone, Nature (London) 185, 762 (1960).
- 30) D. Anderle, P. Kováč u. H. Anderlová, J. Chromatogr. 64, 368 (1972).
- 31) C. C. Sweeley, R. Bentley, M. Makita u. W. W. Wells, J. Am. Chem. Soc. 85, 2497 (1963).
- 32) G. R. Pickering, C. J. Olliff u. K. J. Rutt, Organic Mass Spectrometry 10, 1035 (1975).
- 33) R. Wood, J. Gas Chromatogr. 6, 94 (1968).
- 34) S. Friedman, C. Zahn, M. Kaufman u. I. Wender, Bur. Mines Bull. 1963, 609.
- 35) loc. cit. 31)
- 36) G. G. S. Dutton, K. B. Gibney, G. D. Jensen u. P. E. Reid, J. Chromatogr. 36, 152 (1968).
- 37) B. H. Freeman, H. M. Stephen u. P. van der Bijl, J. Chromatogr. 73, 29 (1972).
- 38) E. C. Horning u. M. G. Horning, in: Advances in Chromatography, A. Zlatkis (Herausg.), S. 226, Chromatogr. Symposium, Houston, Texas 1970
- 39) E. M. Chambez, u. E. C. Horning, Anal. Biochem. 30, 7 (1969).
- 40) A. E. Pierce, Silylation of Organic Compounds, Pierce Chemical Co., Rockford, Ill. 1968
- 41) P. S. Mason u. E. D. Smith, J. Gas Chromatogr. 4, 398 (1966).

- 42) S. Neelakantan, R. Padmasani u. T. R. Seshadri, Tetrahedron 21, 3531 (1965).
- 43) V. Jayalakshmi, S. Neelakantan u. T. R. Seshadri, Indian J. Chem. 7, 56 (1969).
- 44) C. J. Brown, D. E. Clark, W. D. Ollis u. P. L. Veal, Proc. Chem. Soc. 1960, 393.
- 45) J. A. Elix, Aust. J. Chem. 27, 1767 (1974).
- 46) R. Köster, K. L. Amen u. W. V. Dahlhoff, Liebigs Ann. Chem. 1975, 752.
- 47) D. C. de Jongh u. K. Biemann, J. Am. Chem. Soc. 86, 67 (1964).
- 48) W. Krause, Diplomarbeit, Erlangen 1974
- 49) G. v. Unruh, G. Remberg u. G. Spiteller, Chem. Ber. 104, 2071 (1971).
- 50) G. Remberg, H. Luftmann, G. v. Unruh u. G. Spiteller, Tetrahedron 27, 5853 (1971).
- 51) S. Huneck, C. Djerassi, D. Becher, M. Barber, M. v. Ardenne, K. Steinfeld u. R. Tümmler, Tetrahedron 24, 2707 (1968).
- 52) J. A. Elix, Aust. J. Chem. 27, 167 (1974).
- 53) loc. cit. 23)
- 54) Y. Solberg, Z. Naturforsch. 30c, 445 (1975).
- 55) T. K. Murty, J. Sci. Ind. Res. (India) 19B, 508 (1960).
- 56) X. A. Dominguez, J. Castillo u. M. G. Vázquez, Rev. Latinoamer., Quim. 6, 104 (1975).
- 57) loc. cit. 48)
- 58) C. F. Culberson u. M. J. Dibben, Bryologist 75, 362 (1972).
- 59) loc. cit. 45)
- 60) S. Huneck u. K. Schreiber, Phytochemistry 14, 1629 (1975).
- 61) S. Huneck u. R. Tümmler, Liebigs Ann. Chem. 685, 128 (1964).
- 62) W. Zopf, Liebigs Ann. Chem. 364, 273 (1909).
- 63) loc. cit. 54)
- 64) C. H. Fox u. K. Mosbach, Acta Chem. Scand. 21, 2327 (1867).

- 65) P. S. Rao, K. G. Sarma u. T. R. Seshadri, Indian J. Chem. 5, 177 (1967).
- 66) loc. cit. 51)
- 67) M. V. Sargent, P. Vogel u. J. A. Elix, J. Chem. Soc. Perkin I 1975, 1986.
- 68) I. Yosioka, K. Hino, M. Fujio u. I. Kitagawa, Chem. Pharm. Bull. 21, 1547 (1973).
- 69) C. Baker, J. A. Elix, D. P. H. Murphy, S. Kurokawa u. M. V. Sargent, Aust. J. Bot. 21, 137 (1973).
- 70) Y. Solberg, Acta Chem. Scand. 29B, 145 (1975).
- 71) Y. Asahina u. H. Nogami, Ber. 67, 805 (1934).
- 72) J. A. Elix, B. A. Ferguson u. M. V. Sargent, Aust. J. Chem. 27, 2403 (1974).
- 73) loc. cit. 72)
- 74) T. Hirayama, F. Fujikawa, Y. Yosioka u. I. Kitagawa, Chem. Pharm. Bull. 22, 1678 (1974).
- 75) J. A. Elix, Aust. J. Chem. 28, 849 (1975).
- 76) W. Brieger, in: Handbuch der biochemischen Arbeitsmethoden, E. Aberhalden (Herausg.), Abt. I, Teil 10, S. 205, Urban u. Schwarzenberg, Berlin 1923
- 77) O. Hesse, in: Biochemisches Handlexikon, E. Aberhalden (Herausg.), Bd. VII, J. Springer, Berlin 1912
- 78) W. Thies, in: Handbuch der Pflanzenanalyse, G. Klein (Herausg.), Bd. III, 2. Teil, S. 429, J. Springer, Berlin 1932
- 79) loc. cit. 48)
- 80) C. Schöpf u. F. Ross, Liebigs Ann. Chem. 546, 1 (1941).
- 81) D. H. R. Barton, A. M. Deflorin u. O. E. Edwards, J. Chem. Soc. 1956, 530.
- 82) H. Taguchi, U. Sankawa u. S. Shibata, Tetrahedron Letters 42, 5211 (1966).
- 83) S. Safe, L. M. Safe u. W. S. G. Maas, Phytochemistry 14, 1821 (1975).
- 84) O. Hesse, J. Prakt. Chem. 58, 465 (1898).
- 85) C. M. Wetmore, Publ. Mus. Michigan State Univ., Biol. Ser. 1, 369 (1960).

- 86) loc. cit. 62)
- 87) S. Shibata, Nobel Symposium 25, 241 (1974).
- 88) E. Stenhagen, S. Abrahamsson u. F. W. McLafferty (Herausg.), Registry of Mass Spectral Data, Bd. I - IV, John Wiley and Sons, New York 1974
- 89) B. Akermark, Acta Chem. Scand. 21, 589 (1967).
- 90) G. Bendy, J. Santesson u. L. Tibell, Acta Chem. Scand. 20, 1181 (1966).
- 91) J. Santesson, Acta Chem. Scand. 21, 1993 (1967).
- 92) H. Schlenk u. J. L. Gellermann, J. Am. Oil Chem. Soc. 42, 504 (1965).
- 93) Y. Yamamoto u. A. Watanabe, J. Gen. Appl. Microbiol. 20, 83 (1974).
- 94) J. P. Devlin, C. P. Falshaw u. W. D. Ollis, J. Chem. Soc. 1971, 1318.
- 95) R. W. Holton, H. B. Blecker u. T. S. Stevens, Science 160, 545 (1968).
- 96) C. N. Kenyon, J. Bacteriology 109, 827 (1972).
- 97) W. H. Anderson, J. M. Hawkins, J. L. Gellermann u. H. Schlenk, J. Hattori Bot. Lab. 38, 99 (1974).
- 98) H. Glasl u. P. Pohl, Z. Naturforsch. 29c, 399 (1974).
- 99) Y. J. Solberg, Acta Chem. Scand. 11, 1477 (1957).
- 100) Y. J. Solberg, Acta Chem. Scand. 14, 2152 (1960).
- 101) loc. cit. 70)
- 102) loc. cit. 54)
- 103) loc. cit. 48)
- 104) R. Ryhage u. E. Stenhagen, J. Lipid Research 1, 361 (1960).
- 105) M. Barber u. T. O. Merren, Tetrahedron Letters 18, 1063 (1964).
- 106) W. M. Lauer, A. J. Aasen, G. Graff u. R. T. Holman, Lipids 5, 861 (1970).
- 107) A. J. Aasen, W. M. Lauer u. R. T. Holman, Lipids 5, 869 (1970).
- 108) A. Zeman u. H. Scharmann, Fette, Seifen, Anstrichm. 75, 170 (1973).

- 109) T. Curstedt, Biochem. Biophys. Acta 360, 12 (1974).
- 110) R. A. Hites, Anal. Chem. 42, 1736 (1970).
- 111) E. G. Perkins u. P. V. Johnston, Lipids 4, 301 (1969).
- 112) M. G. Horning, G. Casparrini u. E. C. Horning, J. Chromatogr. Sci. 7, 267 (1969).
- 113) loc. cit. 54)
- 114) T. W. Bednar u. D. C. Smith, New Phytologist 65, 211 (1966).
- 115) O. S. Chizhov, B. A. Dmitriev, B. M. Zolotarev, A. Y. Chernyak u. N. K. Kochetkov, Organic Mass Spectrometry 2, 947 (1969).
- 116) E. A. Drew, Dissertation, Oxford 1966
- 117) D. H. S. Richardson u. D. C. Smith, Lichenologist 3, 202 (1966).
- 118) Y. J. Solberg, Bryologist 77, 203 (1974).
- 119) W. A. König, Z. Naturforsch. 29b, 1 (1974).
- 120) W. A. König, H. Bauer, W. Voelter u. E. Bayer, Chem. Ber. 106, 1905 (1973).
- 121) B. Lindberg, C. A. Wachtmeister u. B. Wickberg, Acta Chem. Scand. 6, 1052 (1952).
- 122) B. Lindberg u. B. Wickberg, Acta Chem. Scand. 8, 821 (1954).
- 123) B. Lindberg u. B. Wickberg, Acta Chem. Scand. 16, 2240 (1962).
- 124) B. Lindberg, B. G. Silvander u. C. A. Wachtmeister, Acta Chem. Scand. 17, 1348 (1963).
- 125) B. Lindberg, B. G. Silvander u. C. A. Wachtmeister, Acta Chem. Scand. 18, 213 (1964).
- 126) G. Pueyo, Rev. Bryol. Lichénol. 29, 124 (1960).
- 127) G. Petersen, Tetrahedron 25, 4437 (1969).
- 128) M. Dizdaroglu, D. Henneberg u. C. v. Sonntag, Organic Mass Spectrometry 8, 335 (1974).
- 129) W. V. Dahlhoff, W. Schüßler u. R. Köster, Liebigs Ann. Chem. 1976, 387.
- 130) W. V. Dahlhoff u. R. Köster, J. Org. Chem. 41, 2316 (1976).
- 131) R. Nourish u. R. W. A. Oliver, in: Lichenology: Progress and Problems, D. H. Brown, D. L. Hawksworth u. R. H. Bailey (Herausg.), S. 185, Academic Press, London - New York 1976

Lebenslauf

Werner K r a u s e

geboren am 30. Mai 1949

in Öhringen (Hohenlohe-Kreis)

als Sohn des Arbeiters Richard Krause

und der Hausfrau Gertrud Krause, geb. Luck

Schulbildung:

1956 - 1960 Volksschule in Öhringen

1960 - 1968 Hohenlohe-Gymnasium in Öhringen

Studium:

Wintersemester 1968/69 Beginn des Chemiestudiums an
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

27. April 1971 Vorexamen

19. Februar 1974 Hauptexamen

Von März bis Juli 1974 praktische Ausführung der
Diplomarbeit unter Anleitung von Dr. A. Haag;
seitdem Anfertigung der Dissertation. Ab November
1974 Verwalter einer wissenschaftlichen Assisten-
stelle (Betreuung von Lehramtskandidaten).

Offsetdruckerei NOGL, 8520 Erlangen, Hauptstr. 109, Tel. 22990